

FELLIPE FREITAS BARBOSA

**EFEITOS DO PLASMA SANGÜÍNEO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO BACTERIANO E ESTRUTURA
INTESTINAL DE LEITÕES RECÉM DESMAMADOS EM
DIFERENTES IDADES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para a obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

FELLIPE FREITAS BARBOSA

**EFEITOS DO PLASMA SANGÜÍNEO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO BACTERIANO E ESTRUTURA
INTESTINAL DE LEITÕES RECÉM DESMAMADOS EM
DIFERENTES IDADES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para a obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 18 de janeiro de 2010

Dr. Júlio Maria Ribeiro Pupa

Dr. Francisco C. de Oliveira Silva

Prof. Paulo César Brustolini

Prof. Darci Clementino Lopes

Prof. Aloízio Soares Ferreira
(Orientador)

A minha mãe, Rose, por seu amor, maior do que qualquer coisa nesse mundo, e por ser meu exemplo de vida, garra e superação.

Ao meu pai, Ary pelo amor, pelo incentivo e por acreditar sempre em meus sonhos.

Ao meu irmão, filho, pai e, acima de tudo, grande amigo, Luiz Henrique, pelo carinho e pelo apoio incondicional.

À Fabiane, pelo companheirismo, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.
Por todo seu amor e carinho.

“Quando a corrida é longa o homem precisa de etapas. Não tanto para descansar, mas para fortificar sua perseverança.”

François Garagnon

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Zootecnia, pela possibilidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Aloízio Soares Ferreira, pela orientação, pela dedicação e grande amizade. Por ter me ajudado, ao longo desses anos a formar uma visão crítica sobre a pesquisa, sobre o mundo no qual estamos inseridos e a aprender que devemos, antes de tudo, questionar. Por me fazer perceber que somos passíveis de erros, mas que não devemos nos dar por vencidos e lutar sempre!

Aos meus conselheiros. Professor Juarez Lopes Donzele pelas críticas, sugestões, por ser um exemplo de pesquisador e professor e por ter sido tão importante nos rumos da minha vida profissional. Professor Darci Clementino Lopes, pela serenidade tão necessária para não perdermos o foco e continuar. Pelo exemplo como mestre e pessoa. Pelas oportunidades oferecidas. Pela amizade que perdurará.

Aos professores Paulo Cezar Brustolini e Rita Flávia Oliveira, pelas críticas, sugestões e pela amizade ao longo desses anos.

Ao doutor Júlio Pupa por aceitar prontamente quando convidado a participar dessa banca, pelas críticas e valiosas sugestões para a redação desta tese.

Ao pesquisador da EPAMIG, Francisco Carlos de Oliveira Silva, pelas sugestões e críticas ao trabalho. Por toda ajuda. Pela grande amizade.

Aos grandes amigos Tonucci, Celso, Wagão, Fábio Stelzer, Silvano, Priscila, Tati, Camila, Mauricinho, Renatinha, Roque Jr. e Gustavo pelos momentos de felicidade que estarão para sempre na memória.

Aos parceiros de república Alexix, Fred, Denis, Tofe, Fernando e Felipe pela excelente convivência e companheirismo.

Ao amigo Pedro Eisenlohr pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os colegas e amigos de DZO que comigo dividiram anos, meses ou simples minutinhos no café, sintam-se citados e lembrados nestas breves linhas.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, pela amizade e excelente convívio.

Ao grande grupo de pesquisa, liderado pelo mestre Aloízio, que fez possível esse trabalho.

A todos os companheiros e funcionários do Setor de Suinocultura, pela amizade e pela contribuição na realização do experimento.

BIOGRAFIA

FELLIPE FREITAS BARBOSA, filho de Ary Barbosa Filho e Rosemairy Freitas Lima, nasceu em 26 de junho de 1981, em Muriaé – MG.

Em março de 1999 iniciou, na Universidade Federal de Viçosa, o curso de Zootecnia. Graduou-se em agosto de 2003.

Em março de 2004 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia, na área de Produção e Nutrição de Monogástricos, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de Magister Scientiae em 12 de julho de 2005.

Em agosto de 2005 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na área de Produção e Nutrição de Monogástricos pela Universidade Federal de Viçosa. Em 18 de janeiro de 2010 teve aprovada esta tese para obtenção do título de Doctor Scientiae.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xix
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução geral	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1. Plasma sangüíneo	3
2.3 Plasma sangüíneo em dietas para leitões	6
2.3. Desenvolvimento bacteriano no intestino de leitões e ocorrência de diarréia	8
2.3. Efeitos do plasma sobre as vilosidades intestinais de leitões.....	10
2.4. Efeitos do plasma sobre o desenvolvimento do sistema imune de leitões no pós-desmame.....	12
3. Referências bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 2	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT	24
1. Introdução.....	25
2. Materiais e Método	26
3. Resultados e discussões.....	32
4. Conclusão	40
5. Referências Bibliográficas.....	41
CAPÍTULO 3	46
RESUMO	46

ABSTRACT	47
1. Introdução.....	48
2. Materiais e Método	49
3. Resultados e discussões.....	55
4. Conclusão	60
5. Referências Bibliográficas.....	61
CAPÍTULO 4.	65
RESUMO	65
ABSTRACT	66
1. Introdução.....	67
2. Materiais e Método	68
3. Resultados e discussões.....	74
4. Conclusão	80
5. Referências Bibliográficas.....	81
APÊNDICE.	86

RESUMO

BARBOSA, Fellipe Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2010.
Efeitos do plasma sangüíneo sobre o desenvolvimento bacteriano e estrutura intestinal de leitões recém desmamados em diferentes idades. Orientador: Aloízio Soares Ferreira. Coorientadores: Juarez Lopes Donzele e Rita Flávia Miranda de Oliveira.

Visando-se determinar se o plasma sangüíneo tem outros efeitos sobre leitões desmamados aos 21, 28 e 35 dias de idade que não seja apenas o aumento da quantidade de ração consumida, foram realizados 3 experimentos onde foram utilizados, no total, 63 leitões (16 leitões desmamados aos 21 dias de idade, 24 desmamados aos 28 dias de idade e 24 desmamados aos 35 dias de idade). O desenho experimental utilizado foi de delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (rações com 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5% de plasma sangüíneo), quatro ou seis repetições e um animal por unidade experimental. Os animais desmamados aos 21 dias de idade que receberam rações com plasma sangüíneo tiveram melhores desempenhos e menores quantidades de *E. coli* do que aqueles do tratamento um, que receberam rações sem plasma. Os animais submetidos ao tratamento dois (rações com 2,5% de plasma) tiveram prejuízos menores do que os animais do tratamento um diante da ocorrência de diarreia. O plasma sangüíneo tem efeitos diretos sobre a colonização de *E.coli* no intestino delgado. A inclusão crescente de plasma reduziu linearmente a incidência de colônias de *E. coli* e aumentou linearmente o ganho de peso em leitões desmamados aos 21 dias de idade, não tendo efeito sobre a morfologia intestinal dos animais. Não foram constatadas diferenças entre os tratamentos em relação às conversões alimentares dos animais desmamados aos 28 dias de idade, mas foram em

relação aos ganhos de peso e às quantidades de colônias de *E. coli*. Os animais que consumiram as dietas com plasma sanguíneo apresentaram maiores ganhos de peso e menores quantidades de *E. coli* no intestino delgado do que os animais que receberam dietas sem plasma. Não se observou melhorias dos parâmetros intestinais avaliados diante da suplementação de plasma. Concluiu-se que a inclusão de 2,5% de plasma sanguíneo em pó reduziu a incidência de colônias de *E. coli* em leitões desmamados aos 28 dias de idade criados em condições de desafio. Os animais desmamados aos 35 dias que receberam as dietas contendo plasma sanguíneo apresentaram maiores ganhos de peso e menores quantidades de *E. coli* no intestino delgado que os animais que receberam dietas sem plasma. Embora não analisado estatisticamente, constatou-se que a aplicação de dosagens de antibióticos nos animais submetidos às dietas sem plasma foi bem maior do que as dosagens aplicadas nos animais que receberam dietas contendo plasma. A inclusão de 2,5% e 7,0% de plasma sanguíneo em pó teve efeito benéfico sobre a altura de vilosidade do duodeno e do jejuno de leitões desmamados aos 35 dias de idade. Esses resultados indicam que o uso de plasma em dietas para leitões desmamados aos 35 dias de idade resulta em diminuição do índice de diarreias e na melhoria do ganho de peso dos leitões criados em condições de desafio.

ABSTRACT

BARBOSA, Fellipe Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2010.
Effects of spray dried plasma on wall structure and on the microbiological colonization in the gut of piglets weaned at different ages. Adviser: Aloízio Soares Ferreira. Coadvisers: Juarez Lopes Donzele and Rita Flávia Miranda de Oliveira.

Aiming to determining whether the plasma has other effects on piglets weaned at different ages that are not only related to feed intake increased, three trials were conducted. In trial 1, sixteen piglets weaned at 21 days of age were used in an experiment with randomized blocks design with four treatments (diets with 0.0, 2.5, 5.0 and 7.5% of plasma), four repetitions and one animal experimental unit. Increased levels of spray dried plasma in the diets decreased linearly the occurrence of *E. coli* colonies, increased linearly weight daily gain of piglets, and had no effect on villi height and crypt depth weaned at 21 days of age; In trial 2 and 3, twenty four piglets were used in an experiment with randomized blocks design with four treatments (diets with 0.0, 2.5, 5.0 and 7.5% of plasma), six repetitions and one animal experimental unit. There were equal amounts of feed supplied by repetition in terms of the weight of the animal. In trial 2, the inclusion of 2.5% of spray dried plasma in the diets reduced ($P < 0.10$) the occurrence of *E. coli* colonies in the small intestine of piglets weaned at 28 days of age but did not affect ($P > 0.10$) the performance at 28 days weaned when created in challenge conditions, and there were not beneficial effects on villus height or crypt depth. In trial 3, the inclusion of 2.5% of spray dried plasma in the diets decreased ($P < 0.10$) the occurrence of *E. coli* colonies of piglets weaned at 35 days of

age and the inclusion of 2.5% and 7.0% of spray dried plasma in the diets increased villus height in jejunum and duodenum.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL

A suinocultura é uma atividade em contínua evolução no que tange à genética, manejo, sanidade e nutrição. A melhora no desempenho animal, da qualidade do produto final associados à busca por custos de produção mais baixos são os principais combustíveis para tais melhorias. A alimentação apresenta-se como componente de maior participação nos custos de produção de suínos, independentemente das oscilações de mercado. Portanto, o entendimento dos diversos fatores capazes de influenciar o aproveitamento dos alimentos pelos animais pode ser a chave para o sucesso do programa alimentar utilizado.

Um desses fatores é o desmame, momento no qual o animal é submetido a agentes estressantes que podem causar depressão no consumo e conseqüentemente no desempenho. O leitão é separado da mãe de forma abrupta deixando de receber leite materno, considerado alimento ideal, que ele está adaptado e apto para digerir os nutrientes. A ele é então oferecido dietas sólidas à base de grãos de cereais.

O sistema enzimático dos leitões por não apresentar nem produzir quantidades suficientes de amilases, lipases e outras enzimas responsáveis pela digestão das matérias primas de origem vegetal contribui para a ineficiência do processo de crescimento dos animais. O desenvolvimento do sistema enzimático dos leitões se completa, independentemente do substrato, entre 35 a 42 dias de idade (De Assis Junior et al., 2009) e quando é desmamado antes dos 35 dias o leitão pode não apresentar seu

sistema enzimático pronto para digerir alimentos de origem vegetal, em especial do farelo de soja usado nas dietas a eles fornecidas.

Além disso, a manutenção da integridade do aparelho intestinal dos animais também pode influenciar o aproveitamento dos alimentos pelos leitões recém desmamados. Refere-se aqui tanto à integridade física quanto ao equilíbrio da microflora intestinal. O fornecimento de dietas sólidas pode ocasionar hipersensibilidade intestinal e comprometimento das células epiteliais. Da mesma forma, a ocorrência de diarreia principalmente nas duas primeiras semanas pós desmame, pode ter impactos no desenvolvimento dos leitões. A bactéria *Escherichia coli* apresenta-se como principal agente causador de patogenicidade em leitões (Van Dijk et al., 2001).

Outro problema observado e diretamente ligado ao baixo desempenho de animais pós-desmame tem sido a ingestão limitada de alimentos (Kats et al., 1994a,b; Kats et al., 2001; Gattás et al., 2008). Visando-se minimizar os efeitos do baixo consumo tem-se buscado a inclusão de ingredientes com alta digestibilidade, boa palatabilidade e que não apresentem em sua composição fatores antinutricionais nas dietas pós-desmame.

O plasma sanguíneo pode, portanto, ser uma alternativa interessante para se minimizar os efeitos negativos do desmame. Constituído de proteína de boa qualidade e de boa digestibilidade, o plasma, quando adicionado a dietas complexas de leitões na fase de desmame, pode estimular o sistema imune dos leitões na primeira semana pós-desmame (Barbosa et al., 2007) e aumentar o consumo de ração pelos animais (Campbell et al., 2004; Gattás et al., 2008). Têm-se constatado também que há melhora

no desempenho animal e diminuição dos efeitos negativos causados por *bactérias E. coli* quando plasma é adicionado às dietas.

O aumento no ganho de peso e a diminuição da conversão alimentar diante do aumento de consumo de ração pelo animal têm sido comprovados por meio de diversos experimentos, porém, torna-se necessário verificar se há efeitos benéficos do plasma sobre a ultra estrutura intestinal e sobre o número de unidades formadoras de colônias de *E. coli*, independentemente do consumo de ração, uma vez que ao desmame os leitões começam a se alimentar de dietas com farelo de soja.

As proteínas antigênicas glicinina e β -conglucina presentes no farelo de soja podem alterar a ultra-estrutura das vilosidades intestinais de leitões, especialmente daqueles desmamados aos 21 dias ou menos (Abreu, 1994), o que pode limitar o aproveitamento de nutrientes (Pupa, 2008) e prejudicar o desempenho dos animais (Zangeronimo et al., 2006).

Esta tese foi escrita em capítulos seguindo-se as normas para feitura de tese da Universidade Federal de Viçosa e os capítulos 2, 3 e 4 foram redigidos seguindo-se as normas para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plasma sanguíneo

O plasma sanguíneo é um alimento protéico obtido a partir de sangue bovino e/ou suíno frescos. A qualidade desse alimento está diretamente relacionada com os cuidados quando na obtenção da matéria prima e conseqüente processamento. O

plasma deve sofrer tratamentos prévios que assegurem a inexistência de patógenos, sem interferir no seu modo de ação no organismo (Pinheiro, 2005).

Segundo Araújo et al. (2002) o bom processo de fabricação do plasma, que vai, por conseguinte, assegurar um produto de alta digestibilidade e sanitariamente seguro envolve as seguintes etapas: o sangue é coletado em recipientes de aço inox e a ele é adicionado um anti-coagulante; uma série de filtrações se segue visando-se remover potenciais impurezas; separa-se por centrifugação o sangue em duas frações, células vermelhas e plasma; as células vermelhas são secas por processo *spray-dried* e o plasma é ultra-filtrado para remover parte das cinzas (eletrólitos) que foram adicionadas via anti-coagulante; o plasma concentrado é cuidadosamente seco por *spray-dried*, preservando-se assim a atividade natural das proteínas e destruindo bactérias e vírus patogênicos. É importante ainda, que se evite a contaminação posterior do produto com germes patógenos existentes no ambiente (Gatnau et al., 1995).

Em função do processamento, portanto, pode-se obter um produto final com composições variáveis. Na Tabela 1 podem ser visualizadas diferenças na composição média de plasma sanguíneo segundo duas fontes distintas.

O plasma sanguíneo apresenta-se como uma complexa mistura de diferentes compostos, incluindo albumina e globulina, enzimas, peptídeos e lipídeos. Contém entre 64 a 92% de proteína de alta qualidade. A sua fração protéica divide-se em uma fração de alto peso molecular, composta principalmente por imunoglobulinas, especialmente a IgG; uma fração de baixo peso molecular (LMW); e uma fração intermediária (albumina e ALB). Destas frações, a IgG e a ALB produzem um efeito

similar à adição de plasma, sendo que, a IgG parece ser a fração mais ativa (Weaver et al., 1995; Grinsted et al., 2000; Bossi et al., 2001).

Tabela 1 – Composição média do Plasma Sangüíneo

Nutrientes	Rostagno et al. (2005)	AP920 ¹
Energia Digestível (kcal/kg)	4049	4108
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3714	3906
Proteína Bruta (%)	72,20	78,00
Extrato Etéreo (%)	1,35	0,30
Matéria Mineral (%)	11,93	8,50
Cálcio (%)	0,20	0,15
Fósforo Total (%)	0,44	1,30
Sódio (%)	3,12	2,20
Potássio (%)	0,56	0,30
Arginina (%)	3,88	4,70
Histidina (%)	2,14	2,80
Isoleucina (%)	2,27	2,90
Leucina (%)	7,13	7,80
Lisina (%)	6,69	6,80
Metionina (%)	1,03	0,70
Fenilalanina (%)	4,10	4,60
Treonina (%)	4,40	4,80
Triptofano (%)	1,26	1,40
Valina (%)	4,97	5,30
Met+Cis (%)	3,08	-

¹Informativo técnico APC, Inc.

Cain (1995) avaliou as diferentes frações do plasma sangüíneo. Em seu experimento o autor utilizou cinco tratamentos, controle negativo, controle positivo e dietas com as diferentes frações do plasma (alto, médio e baixo pesos moleculares) em níveis suficientes a prover 7% de proteína plasmática. O desenvolvimento daqueles animais que receberam o controle positivo só foi semelhante ao desenvolvimento

daqueles que receberam a dieta com a fração de alto peso molecular (imunoglobulinas). Tal resultado leva à hipótese de que a fração de alto peso molecular presente no plasma pode ser responsável pela melhora no desempenho dos animais alimentados com plasma sanguíneo.

2.2. Plasma sanguíneo em dietas para leitões

O plasma sanguíneo é mundialmente aceito como alimento em dietas para suínos e em particular para leitões nas primeiras semanas pós desmame. Vem sendo utilizado comercialmente há mais de 20 anos, visando-se melhora da taxa de crescimento, do consumo de alimentos e da conversão alimentar dos animais. Nelssen et al. (1999) afirmaram que as proteínas plasmáticas são absolutamente necessárias nas dietas para leitões desmamados.

O plasma sanguíneo é isolado do sangue coletado em abatedouros comerciais devidamente inspecionados. Normalmente é de origem suína ou bovina. Tal isolado é processado resultando no plasma sanguíneo, que, se seguidas as especificações de segurança alimentar no seu processamento, é um produto seguro que não expõe a nenhum risco de contaminação cruzada o suíno que dele se alimentar. Isso é devido, principalmente ao processo de *spray-drying*, capaz de neutralizar qualquer contaminação bacteriana.

Campbell et al. (2001) realizaram um estudo onde avaliou-se se leitões recebendo dietas com 8% de inclusão de plasma sanguíneo desenvolveriam respostas à patógenos potencialmente contaminantes do plasma sanguíneo. Os autores observaram que os animais não desenvolveram anticorpos para a Parvovirose Suína, Doença de

Aujesky, síndromes suínas respiratórias dentre outras. Além disso, os autores relatam uma melhora do desempenho dos animais quando comparados aos do grupo controle (sem a inclusão de plasma).

Resultados observados quando se avalia a inclusão de plasma sanguíneo são o aumento no consumo de ração e a melhora do ganho de peso (Coffey e Cromwell, 2001). Não se tem de maneira clara, no entanto, de que modo o plasma sanguíneo age no organismo animal e nem quais seus efeitos sobre a imunidade e consumo de alimento pelos leitões (Pierce et al., 2005). Fatores tais como preservação das estruturas intestinais, podem explicar parte das melhorias obtidas com o uso de plasma sanguíneo.

Ermer et al. (1994) sugerem que a melhora no desempenho de leitões alimentados com plasma se deve diretamente ao estímulo no apetite, ou seja, ao aumento do consumo de ração. Outros autores sugerem que as respostas positivas podem resultar pela presença de imunoglobulinas específicas (Gatnau et al., 1995; Owen et al., 1995; Weaver et al., 1995). Tal afirmativa é baseada em resultados de pesquisas que mostram que o ganho de peso e o consumo de ração de leitões recebendo plasma sanguíneo são mais pronunciados quando os animais se encontram em ambientes desafiados, em comparação com animais mantidos em ambientes considerados limpos (Coffey e Cromwell, 1995).

Alguns autores relatam diminuição de doenças intestinais diante da suplementação de plasma (Van der Peet- Schwering e Binnendijk 1995). Por outro lado, Van Dijk et al. (2002) não observaram efeitos do plasma sanguíneo sobre a morfologia intestinal de suínos nem sobre o número de colônias bacterianas nas fezes. Touchette et al. (1996) sugerem que o plasma sanguíneo pode atuar de diferentes maneiras no lúmem intestinal, sendo uma dessas a atividade contra a enterotoxemia

induzida por *E. coli*. Owusu-Asiedu et al. (2003) observaram a redução da enterotoxemia induzida por *E. coli* em animais recebendo plasma sanguíneo. Bosi et al. (2004) sugerem que os mecanismos pelos quais o plasma sanguíneo reduz infecções patogênicas se dá pelo aumento da imunidade local e/ou redução da adesão de patógenos à mucosa devido às imunoglobulinas e glicoproteínas presentes neste ingrediente (atuando como núcleos de enlace nas fibrilas da *E. coli*).

2.3. Desenvolvimento bacteriano no intestino de leitões e ocorrência de diarreia

A microflora do trato intestinal do suíno é formada por grande número de microorganismos, com quantidades superiores a 10^4 desses microorganismos colonizando o aparelho intestinal. São encontrados microorganismos Gram Positivos e Gram Negativos em todo o trato digestivo de suínos saudáveis. O ceco e o intestino grosso são importantes locais de fermentação microbiana. O aparelho intestinal é uma barreira especializada, altamente adaptada ao ambiente e que permite a absorção de um grande número de nutrientes.

A regulação desse sistema e sua interação com a população microbiana é um complexo processo, do qual participam estímulos nervosos via mediadores endócrinos, imunes e inflamatórios. A população microbiana muda ao longo do tempo. Isto ocorre à medida que o trato gastrointestinal aumenta e as dietas e os substratos mudam, como, por exemplo, ao desmame, diante da mudança na alimentação do leitão.

Sabe-se que a barreira entre as células epiteliais e o ambiente composto pela ingestão e a microbiota é mantida pelo muco e pelo epitélio que ajudam ou participam da digestão e absorção de nutrientes e evitam danos que podem ser causados por

toxinas e microorganismos patogênicos ao trato gastrointestinal dos leitões. Mudanças na dieta podem afetar a integridade intestinal tanto na composição bacteriana quanto em sua integridade física. Diante de danos causados à parede celular associados, por exemplo, ao excesso de nutrientes altamente fermentáveis oferecidos à microbiota intestinal, podem ocorrer alterações de pH, levando à proliferação de bactérias indesejáveis como a *E. coli*, além de inflamações e ativação do sistema imune.

Apesar de não estar associado diretamente ao desenvolvimento e à alteração da microflora intestinal, o plasma, como já mencionado anteriormente apresenta-se como potente regulador da ação de bactérias indesejáveis, mais precisamente, da *E. coli*. Novamente, tal ação se dá pela redução da adesão desses microorganismos patogênicos à mucosa devido às glicoproteínas presentes no plasma, que atuam como núcleos de enlace nas fibrilas da *E. coli* (Sanchez et al., 1993).

Uma série de experimentos foi conduzida na Universidade Federal de Viçosa para avaliarem-se os efeitos do plasma sobre o número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* no íleo de animais desmamados em diferentes idades. Em adição, avaliou-se a ocorrência de diarreia nos animais.

Campos et al. (2008), trabalhando com animais desmamados aos 21 dias de idade e com níveis crescentes de inclusão de plasma sanguíneo nas dietas verificou que os animais que receberam rações com plasma sanguíneo apresentaram menores quantidades de unidades formadoras de colônia de *E. coli* do que aqueles do tratamento controle, ração sem plasma. Os autores verificaram ainda que houve uma relação direta entre a quantidade de colônias de *E. coli* e a ocorrência de diarreias, com piora no desempenho dos animais que não receberam plasma. Os autores relatam que os leitões que foram criados em condições de desafio sanitário, o qual consistiu no alojamento

dos leitões em uma sala de creche que estava ocupada com animais mais velhos e que não foi limpa e nem desinfetada.

Oliveira Junior et al. (2008) avaliaram a ação do plasma sobre as UFC de *E. coli* em animais mais velhos, desmamados aos 28 dias. Da mesma forma do que foi observado para animais desmamados aos 21 dias, os autores verificaram a redução do número de colônias de *E. coli* no intestino de animais alimentados com dietas contendo plasma sanguíneo quando comparados àqueles que não receberam o plasma.

Finalizando essa série de experimentos, Ferreira et al. (2008) constataram redução no número de UFC de *E. coli* no intestinos de leitões desmamados aos 35 dias. Observaram ainda que tais animais obtiveram maiores ganhos de peso, possivelmente associado à redução da ação dos microorganismos patogênicos.

2.4. Efeitos do plasma sobre as vilosidades intestinais de leitões

No momento do desmame o leitão está sujeito a diversos fatores estressantes, (ex: mudança na alimentação, separação da mãe, mudança para um novo ambiente) que causam queda no desempenho. Em associação pode-se considerar mudanças na histologia e bioquímica do intestino delgado, tais como atrofia de vilosidades e hiperplasia das criptas, o que está associado com redução da capacidade digestiva e absorptiva do leitão nas primeiras semanas pós desmame.

Essas mudanças no trato gastrointestinal dos leitões estão muitas vezes ligadas à hipersensibilidade alimentar às proteínas antigênicas da soja, glicinina e β -conglucina, que pode levar à atrofia das vilosidades e ao aumento da profundidade de criptas no intestino (Nunes et al., 1996; Bertol et al. 2001).

O plasma parece manter a integridade intestinal, reduzindo os efeitos deletérios ao desmame. Os resultados encontrados na literatura não são consistentes, entretanto. O que se tem observado é que os efeitos positivos do plasma sanguíneo tem sido mais perceptíveis em condições adversas de manejo, com uma maior resposta produtiva nos animais com uma maior exposição a patógenos (Sthaly et al.,1996).

Yi et al. (2005), em um estudo com leitões desmamados precocemente (17 ± 2 dias de idade), avaliaram o efeito da inclusão de plasma e nucleotídeos nas dietas pós-desmame sobre a morfologia do intestino delgado de animais desafiados com *E. coli*. Os autores analisaram altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilo:cripta, área e volume dos vilos, em três segmentos do intestino delgado (jejuno proximal e médio e íleo) e observaram que animais desafiados com *E. coli* recebendo dietas com a inclusão tanto de plasma quanto de nucleotídeos mantiveram a integridade intestinal no jejuno médio quando comparados aos animais não desafiados por *E. coli*. Da mesma forma não houve diferença na altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade, embora tenham apresentado menor volume de vilosidades. Os resultados observados no íleo seguiram a mesma tendência, com os animais desafiados que receberam plasma tendo a integridade intestinal mantida, com resultados similares entre todos os parâmetros analisados quando comparados aos animais não desafiados.

Bosi et al. (2004) observaram que animais desmamados aos 21 dias, desafiados com *E. coli* e recebendo dietas com a inclusão de 6,0% de plasma sanguíneo apresentaram melhora do desempenho devido à diminuição dos efeitos deletérios de uma inflamação causada pela ação dos microorganismos patogênicos. Estes autores relataram a diminuição dos danos causados à mucosa intestinal e a redução da

expressão de citocinas pró-inflamatórias como sendo as causas da redução dos processos inflamatórios.

Algumas frações do plasma sanguíneo, como fatores de crescimento epidermal podem atuar de maneira trófica às vilosidades do intestino delgado. Além disso a própria presença de imunoglobulinas pode contribuir para a redução da atrofia das vilosidades e comprometimento da morfologia intestinal. Nofrarías et al. (2006) não observaram, no entanto, efeitos da inclusão de plasma sobre a altura de vilosidade e profundidade de cripta de leitões desmamados aos 20 dias, sugerindo que o plasma não tem efeitos tróficos específicos tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso, não evitando, portanto, danos causados à parede intestinal associado com o desmame.

Van Dijk, et al. (2002) realizaram um estudo para avaliar se a inclusão de 8% de plasma sanguíneo em dietas para leitões desmamados aos 18 dias realmente preveniria a atrofia das vilosidades intestinais devido à ação trófica. Os autores avaliaram, dentre outras características, altura de vilosidade e profundidade de cripta. Não se observou efeito do plasma dietético sobre tais características, resultado que vai de encontro ao observado por Nofarías et al. (2006).

2.5. Efeitos do plasma sobre o desenvolvimento do sistema imune de leitões no pós-desmame.

Imediatamente após o nascimento o leitão neonatal é dependente da ingestão do colostro e do leite materno para sua proteção e sobrevivência. Nas primeiras mamadas o animal recebe imunoglobulinas através do colostro que são capazes de atravessar a parede intestinal durante as primeiras horas de vida. No entanto a permeabilidade da

membrana em relação às imunoglobulinas diminui de forma acentuada a partir da 12^o hora de vida do leitão.

A partir daí certa imunidade local nas paredes intestinais pode ser conferida pelo consumo do leite materno pelo animal através do aporte de imunoglobulinas. Tais imunoglobulinas parecem estimular de alguma forma o desenvolvimento de células do sistema imune, como as células T e o desmame precoce pode reduzir tal processo dramaticamente (Stokes et al., 2004). O animal ainda está desenvolvendo seu sistema imune aproximadamente até a quinta semana pós-desmame e uma série de mudanças ocorre no ainda imaturo sistema como o aumento do número de neutrófilos circulantes e da habilidade de resposta aos estímulos externos (Miller et al., 1994).

A sobrevivência do leitão não depende somente da ingestão dessas macromoléculas, mas também da sua própria capacidade em utilizá-las, frente a desafio. Essa capacidade de reação do leitão, no entanto, é limitada, principalmente em virtude dessa imaturidade do sistema imunológico. Portanto, qualquer estresse, problema digestivo, de manejo ou combinado, pode vir a afetar os leitões em momentos críticos (pós-desmame até 35 dias de idade) do ponto de vista imunológico.

Dessa forma, reduzindo-se desafios imunológicos ou então aumentando a habilidade dos leitões em enfrentar tais desafios pode reduzir o desvio de nutrientes para o sistema imune ativado e conseqüentemente melhorar o desempenho animal.

Alguns alimentos protéicos são adicionados às dietas com funções que vão além de simplesmente fornecer aminoácidos para a síntese muscular. Certas proteínas têm outras funções além da citada e acredita-se que diversas destas podem melhorar o *status* imunológico de leitões desmamados (Stein, 2007). A inclusão de plasma sanguíneo nas dietas de creche pode atuar dessa forma (Touchette et al., 2002; Bosi et

al., 2004), o que reduz a susceptibilidade dos animais a infecções por *E. coli* (Bosi et al., 2001; Van Dijk et al., 2002, Owusu-Asiedu et al., 2003).

Como dito anteriormente, as imunoglobulinas presentes no plasma são as chamadas “unidades funcionais” que fornecem imunidade local aos leitões (Pierce et al., 2005). Resultados de pesquisas mais recentes indicam que o mecanismo de ação do plasma sobre o desempenho animal envolve a regulação do GALT – *gut-associated lymphoid tissue**. O plasma também aparece como fator de regulação de processos inflamatórios (Touchette et al., 2002).

Bosi et al. (2004) observaram que a expressão de citocinas pro-inflamatórias foi menor em animais que receberam plasma, o que, de certa forma, contribui para o aumento do consumo de alimentos e conseqüente direcionamento dos nutrientes para produção (ganho de peso) e não para a manutenção do sistema imune ativado (Moretó et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados por Moretó et al. (2008) e Pérez-Bosque et al.(2008). (*O sistema imune do aparelho digestivo é chamado muitas vezes como *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) e trabalha na proteção do organismo contra a invasão de substâncias estranhas.)

Tais efeitos sobre o perfil de citocinas ativadas na mucosa podem estar associados à redução de processos inflamatórios na mucosa intestinal diante da suplementação dietética de plasma sanguíneo (Moretó et al., 2009), mostrando os efeitos preventivos do plasma sobre mudanças drásticas na permeabilidade da mucosa intestinal em leitões desafiados imunologicamente (Pérez-Bosque et al., 2004; Pérez-Bosque et al., 2006).

Não é surpresa, portanto, que uma série de estudos demonstram que a inclusão de plasma nas dietas de leitões nas duas primeiras semanas pós-desmame leva ao

aumento do ganho diário médio em até 25% (Coffey e Cromwell, 2001; van Dijk et al., 2001; Barbosa et al., 2007; Gattás et al., 2008).

Touchette et al. (2002) observaram que a ativação do sistema imune foi menor em leitões alimentados com dietas contendo plasma sanguíneo quando comparados aos animais que não receberam o plasma.

Moretó et al. (2009), em uma série de estudos realizados com ratos como modelos para inflamação intestinal, observaram que as cobaias desafiadas com enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* alimentadas com dietas contendo plasma apresentaram redução na produção de citocinas pro-inflamatórias de mucosa e aumento na produção de citocinas antiinflamatórias (IL-10). Isso dá suporte à hipótese de que o plasma diminui a estimulação das respostas imunes em nível de mucosa pelo aumento da secreção de IL-10.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.L.T. Efeito da proteína do farelo de soja sobre o desempenho e ocorrência de alterações digestivas em leitões desmamados aos 21 dias de idade. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 79p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.

ARAÚJO, L. F., JUNQUEIRA, O.M., ARAÚJO, C.S.S. Proteína sanguínea na alimentação de leitões. Informe Técnico, **Suinocultura Industrial**, número 2, 2002.

BARBOSA, F.F.; FERREIRA, A.S.; SILVA, F.C.O. et al Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**. V.36, n.4, p.1052-1060, 2007 (supl).

BERTOL, T. M.; JORGE, N. M.; LUDKE, V.; FRANKE, M. R. Proteínas da Soja Processadas de Diferentes Modos em Dietas para Desmame de Leitões. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**. V.30, n.1, p.150-157, 2001.

BOSI, P.; HAN, I. K.; JUNG, H. J. et al. Effect of different spray dried plasmas on growth, ileal digestibility, nutrient deposition, immunity and health of early weaned pigs challenged with E. coli K88. **Asian-Aus. J. Anim. Sci.**, v.14, p.1138–1143, 2001.

BOSI, P. et al. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic Escherichia coli K88. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.1764–1772, 2004.

CAIN, C.M. The mode of action of spray-dried porcine plasma in weaning pigs. **Proceedings of American Association of Swine Practitioners**, março, p.225-226, 1995.

CAMPBELL, J. M.; BORG, B.S.; POLO, J.; TORRALLARDONA, D. E CONDE, R. Impact of spray-dried plasma (Appetein) and colistin in weanling pigs challenged with *Escherichia coli*. **Proceedings of Allen D. Lemman Swine Conference**, p.28:7, 2001.

CAMPOS, P. F., GRAÑA, G.L.; FERREIRA, A.S. et al. Plasma sanguíneo para leitões desmamados aos 21 dias recebendo mesmas quantidades de ração. **In: Anais da 45^o Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Lavras, MG, 2008.

COFFEY, R.D. e CROMWELL, G.L. The impact of environment and antimicrobial agents on the growth response of early-weaned pigs to spray-dried porcine plasma. **Journal of Animal Science**, v.73, n.9, p.2532-2539, 1995.

COFFEY, R. D., e CROMWELL, G. L. Use of spray-dried animal plasma in diets for weanling pigs. **Pig News Inf.**, v.22, p.39-48, 2001.

ERMER, P.M.; MILLER, P.S.; LEWIS, A.J. Diet preference and meal patterns of weanling pigs offered diets containing either spray-dried porcine plasma or dried skim milk. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1548-1554, 1994.

FERREIRA, A.S. et al. Nível de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 28 dias de idade. **In: Anais da 45^o Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Lavras, MG, 2008.

GATNAU, R.; CAIN, C.; DREW, M. et al. Mode of action of spray-dried porcine plasma in weaning pig. *J. Anim. Sci.*, v.72, suppl. 1, p. 82. 1995.

GATTÁS, G. et al. Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 14 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.37, n.2, p.278-285, 2008.

GRINSTEAD, G.S.; GOODBAND, R.D.; DRITZ, S.S. Effects of whey protein product and spray-dried animal plasma on growth performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.78, p.647-657, 2000.

KATS, L.J., NELSEN, J.L., TOKACH, M.D. et al. The effects of spray-dried blood meal on growth performance of the early-weaned pig. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2860-2869, 1994a.

KATS, L.J., NELSEN, J.L., TOKACH, M.D. et al. The effect of spray-dried porcine plasma on growth performance in the early-weaned pig. **Journal of Animal Science**, v.72, n.8, p.2075-2081, 1994b.

MILLER B.G. et al. The effect of delayed weaning on the development of oral tolerance to soyabean protein in pigs, **Brit. J. Nutr.** v.71, p.615–625, 1994.

MORETÓ, M.; MIRÓ, L.; POLO, J. et al. Oral porcine plasma proteins prevent the release of mucosal pro-inflammatory cytokines in rats challenged with *S. aureus* enterotoxin B. **Digestive Disease Week**, San Diego, CA, May 17–22, 2008.

MORETÓ, M. e PÉREZ-BOSQUE, A. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. **Journal of Animal Science**, v. **87**, p.92-100, 2009.

NELSEN, J. L.; DRITZ, S. S.; TOKACH, M. D. e GOODBAND, R. D. Nutritional programs for segregated early weaning. In: **Diseases of Swine**. 8th ed. Iowa State Univ. Press, Ames p. 1045–1056. 1999.

NOFRARÍAS, M.; MANZANILLA, E. G.; PUJOLS, J. et al. Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p.2735–2742, 2006.

NUNES, J. R.V.; DIERCKX, S.M.A.G.; BERTO, D.A.; DIAS, E. Efeito do processamento do grão de soja sobre o desempenho de suínos de diferentes pesos. **Revista Computadorizada de Producción Porcina**, v. 3, número 3, 1996.

OLIVEIRA JUNIOR et al. Plasma sanguíneo para leitões desmamados aos 28 dias recebendo mesmas quantidades de ração. **In:** Anais da 45^o Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Lavras, MG, 2008.

OWEN, K. Q.; NELSEN, J. L.; GOODBAND, R. D. et al. Effects of various fractions of spray-dried porcine plasma on performance of early-weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v.73 (Suppl.1):81 (Abstr.), 1995.

OWUSU-ASIEDU, A., C.; NYACHOTI, M. e MARQUARDT, R. R. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic Escherichiacoli (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk

antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1790–1798, 2003.

PÉREZ-BOSQUE, A., C.; AMAT, J.; POLO, J.; CAMPBELL, M.; CRENSHAW, J.; RUSSELL, L. e MORETÓ, M. Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. **J. Nutr.**, v.136, p.2838– 2843, 2006.

PÉREZ-BOSQUE, A.; MIRÓ, L.; POLO, J.; RUSSELL, L.; CAMPBELL, J.; WEAVER, E.; CRENSHAW, J. e MORETÓ, M. Dietary plasma proteins modulate the immune response of diffuse gut-associated lymphoid tissue in rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. **J. Nutr.**, v.138, p.533–537, 2008.

PIERCE, J. L.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D. e COFFEY, R. D. Assessment of three fractions of spray-dried plasma on performance of early-weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v.73(Suppl.1), p.81 (Abstr.), 1995.

PIERCE, J. L.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D.; RUSSELL, L. E. e WEAVER, E. M. Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs. **J Anim Sci.**, v.83, p.876-2885, 2005.

PINHEIRO, F.M. L. Estudo sobre fontes de proteína de origem animal e vegetal em dietas para leitões no período de creche. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2005. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará.

PUPA, J.M.R. Saúde intestinal dos leitões: o papel de alguns agentes reguladores. **In:** SIMPÓSIO BRASIL SUL DE SUINOCULTURA, Chapecó. Anais do I Simpósio

Brasil Sul de Suinocultura, 2008. v. 1, p.13 – 27. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008.

SANCHEZ, R., L. et al. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* cells expressing F17 fimbriae to small intestinal mucus and brush-border membranes of young calves. **Microb. Pathog.**, v.15, p.207–219, 1993.

STEIN, H. Feeding the pigs' immune system and alternatives to antibiotics. **In:** London Swine Conference – Today's Challenges... Tomorrow's Opportunities Londres, Inglaterra, 2007.

STHALY, T. Influencia de la activación del sistema inmunitario sobre la productividad y las características nutricionales de dietas para cerdos. **Avances en nutrición e alimentación animal**. Eds. REBOLLAR, P.G.; MATEOS, G.G.; BLAS, C. Madrid, 96p., 1996.

STOKES, C. R. et al. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. **Anim. Res.**, v.53, p. 325–334, 2004.

TOUCHETTE, K.J.; ALLEE, G.L.; NEWCOMB, M.D. The effects of plasma, lactose, and soil protein sources fed in a phase 1 diet on nursery performance. **Journal of Animal Science**, v.74, (Suppl.1), p.170, 1996.

TOUCHETTE, K.J.; CARROL, J.A.; ALLEE, G.L. et al. Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I Effects on the immune axis of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.80, n.494, p. 494-501, 2002.

VAN DIJK, A. J.; EVERTS, H.; NABUURS, M. J. A. et al. Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: A review. **Livest. Prod. Sci.**, v.68, p.263–274, 2001.

VAN DIJK, A. J.; NIEWOLD, T. A.; NABUURS, M. J. et al. Small intestinal morphology and disaccharidase activities in early-weaned piglets fed a diet containing spraydried porcine plasma. **J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.49, p.81–86, 2002.

WEAVER, E. M.; RUSSELL, L. A.; DREW, M. D. The effects of spray dried animal plasma fractions on performance of newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, 73:81 (Supl 1), 1995.

YI, G.F.; CARROLL, J.A.; ALLEE, G.L. et al. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of Escherichia coli K88+-challenged weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.83, p.634-643, 2005.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO PLASMA SANGUÍNEO SOBRE O DESENVOLVIMENTO BACTERIANO INTESTINAL DE LEITÕES DESMAMADOS AOS 21 DIAS DE IDADE.

Resumo: Visando-se determinar se o plasma sanguíneo tem outros efeitos sobre leitões desmamados aos 21 dias de idade que não sejam apenas aumento da quantidade de ração consumida, foram utilizados 16 leitões desmamados aos 21 dias de idade em um experimento com delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (rações com 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5% de plasma sanguíneo), quatro repetições e um animal por unidade experimental. Os animais que receberam rações com plasma sanguíneo tiveram melhores desempenhos e menores quantidades de *E. coli* do que aqueles do tratamento um, que receberam rações sem plasma. Os animais submetidos ao tratamento dois (rações com 2,5% de plasma) tiveram prejuízos menores do que os animais do tratamento um diante da ocorrência de diarreia. O plasma sanguíneo tem efeitos diretos sobre a colonização de *E.coli* no intestino delgado. A inclusão crescente de plasma reduziu linearmente a incidência de colônias de *E. coli* e aumentou linearmente o ganho de peso em leitões desmamados aos 21 dias de idade, não tendo efeito sobre a morfologia intestinal dos animais.

Palavras-chave: desempenho, desmame precoce, diarreias, *Escherichia coli*

EFFECTS OF SPRAY DRIED PLASMA ON MICROBIOLOGICAL DEVELOPMENT IN THE GUT OF PIGLETS WEANED AT 21 DAYS OF AGE.

Abstract: Aiming to determining whether the plasma has other effects on 21 days of age weaned piglets that are not only related with feed intake increased, 16 piglets were used in an experiment with randomized blocks design with four treatments (diets with 0.0, 2.5, 5.0 and 7.5% of blood plasma), four repetitions and one animal experimental unit. Animals receiving diets with blood plasma had better performance and smaller quantities of *E. coli* colonies that those treatment one, who received rations without blood plasma. When there compared the results of the animals submitted to treatment one (diet without blood plasma) with those submitted to treatment two (2.5% diets with blood plasma) can be verified that in both, two animals had persistent diarrhea for up to three days, however the animals of treatment two had smaller losses than the animals of the treatment one. In conclusion, increased levels of spray dried plasma in the diets decreased linearly the occurrence of *E. coil* colonies and increased linearly weight daily gain of piglets weaned at 21 days of age, and had no effect on villi height and crypt depth.

Keywords: diarrhea, early weaning, *Escherichia coli*, performance

1. INTRODUÇÃO

Os leitões desmamados antes dos 35 dias de idade têm se mostrado sensíveis às quantidades e à qualidade da proteína na dieta devido às necessidades energéticas ao desmame, que são aumentadas em função dos desafios ambientais, em especial temperaturas baixas; aos riscos de diarreias, face à presença de proteínas não degradadas no intestino grosso e ao aumento da colonização por *E. coli* tanto no intestino grosso quanto no intestino delgado; e à limitação da capacidade de ingestão de alimentos, especialmente na forma sólida. Para que se consigam taxas de absorção de aminoácidos adequadas ao desenvolvimento normal do leitão, tem-se preconizado que as fontes protéicas devam ser palatáveis e de boa digestibilidade e ainda que essas fontes devam estar isentas de fatores antinutricionais, tais como antiproteases, aminas biógenas e fatores alergênicos.

Têm-se atribuído ao plasma sangüíneo, quando incluído em pelo menos 5,0% nas rações efeitos estimulantes na ingestão de alimentos para leitões desmamados aos 21 dias de idade, com melhora no ganho de peso e na conversão alimentar (Campbell et al., 2004). Tem-se atribuído também ao plasma, a capacidade de aumentar a imunidade dos leitões na primeira semana após o desmame aos 21 dias de idade devido às imunoglobulinas ativas que ele possui (Gatnau et al., 1995).

Além disso, o plasma pode preservar as vilosidades intestinais de leitões desmamados aos 21 dias de idade, que recebem agora rações contendo farelo de soja, principal fonte de proteína utilizada nas rações de suínos. O farelo de soja, devido à presença das proteínas antigênicas glicinina e β -conglucina, pode provocar reações de hipersensibilidade transitória na mucosa intestinal com diminuição da altura das

vilosidades e aumento da profundidade da cripta, com redução do número de enterócitos maduros nas vilosidades e redução da capacidade digestiva e absorptiva no intestino, com conseqüente queda no desempenho de leitões após o desmame. (Bertol et al., 2001).

Dessa forma é possível que o plasma tenha efeitos no próprio intestino delgado com a manutenção da integridade das vilosidades intestinais e sobre o controle de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli*, aumentando assim o ganho de peso e diminuindo a conversão alimentar dos animais, mesmo com consumos iguais.

Assim, verificou-se a necessidade de se estudar se há efeitos benéficos do plasma sobre a ultra-estrutura intestinal e também se há redução do número de unidades formadoras de colônias de *E. coli* com conseqüente melhora no desempenho de leitões desmamados aos 21 dias de idade, independentemente do consumo de ração.

2. MATERIAIS E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, no período de julho a outubro de 2007.

Foram utilizados 24 leitões desmamados aos 21 dias de idade distribuídos em delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos, quatro repetições e um animal por unidade experimental. O critério para formação dos blocos foi o peso do animal ao desmame. Os tratamentos usados foram rações com 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5% de inclusão de plasma sangüíneo.

Foram usados os teores de energia digestível, os níveis de proteína, de cálcio, de fósforo total e fósforo disponível das dietas experimentais conforme preconizado em Rostagno et al. (2005) e a relação cálcio:fósforo total foi mantida em 1,35 em todas as dietas experimentais.

Lactose foi adicionada às dietas de forma a se garantir um nível próximo de 12,0% deste carboidrato em todas. Além disso, foram adicionados os aminoácidos lisina, metionina e treonina nas dietas experimentais de forma a se garantir que todas mantivessem o mesmo perfil em aminoácidos digestíveis de acordo com o preconizado por Rostagno et al. (2005).

As rações foram constituídas por milho, farelo de soja, leite desnatado, plasma sanguíneo, lactose, óleo, fosfato bicálcico, calcário, sal, premix de vitaminas, premix de minerais e aminoácidos e as suas composições centesimais e calculadas encontram-se apresentadas na Tabela 2.

As dietas foram umedecidas (50,0% ração e 50,0 água) e fornecidas aos animais de forma controlada em quantidades variáveis em quatro refeições diárias por um período de uma hora por trato, por doze dias. A quantidade de ração fornecida foi em função do consumo dos animais do tratamento um. Em testes anteriores determinou-se o consumo de ração inicial dos animais desmamados aos 21 dias de idade recebendo a dieta do tratamento um. As sobras de ração foram secas e pesadas e quantidades iguais foram fornecidas na refeição seguinte, de modo a se assegurar consumos iguais por repetição.

Tabela 2 – Composições centesimais e calculadas das rações experimentais.

<i>Composição centesimal</i>	Ingredientes	Níveis de plasma (%)			
		0	2,5	5,0	7,5
Milho		49,94	49,51	49,65	49,30
Farelo de Soja		25,70	25,70	25,70	25,70
Leite em pó		16,20	11,90	5,50	-----
Lactose		2,33	4,96	8,88	12,20
Plasma SP		-----	2,50	5,00	7,50
Óleo de Soja		2,42	1,82	1,46	1,18
Fosfato Bicálcico		1,60	1,75	1,92	2,07
Calcário		0,70	0,70	0,71	0,85
Sal		0,35	0,35	0,35	0,35
Premix Vitamínico ¹		0,15	0,15	0,15	0,15
Premix Mineral ²		0,10	0,10	0,10	0,10
L-Lisina HCL (98%)		0,231	0,256	0,285	0,293
DL-Metionina (98%)		0,152	0,168	0,176	0,182
L-Treonina (98%)		0,128	0,131	0,123	0,125
<i>Composição calculada³</i>					
ED (Kcal/Kg)		3500	3500	3500	3500
Proteína bruta (%)		21,20	21,53	21,20	21,13
Ca (%)		0,886	0,892	0,882	0,891
Ptotal(%)		0,652	0,661	0,658	0,660
Pdig (%)		0,482	0,491	0,488	0,490
Na (%)		0,270	0,274	0,280	0,280
Lisina dig. (%)		1,450	1,470	1,476	1,511
Treonina dig. (%)		0,913	0,926	0,930	0,952
Triptofano dig. (%)		0,247	0,250	0,251	0,257
Met+Cis dig. (%)		0,812	0,823	0,826	0,846
Arginina dig. (%)		1,055	1,134	1,206	1,280
Valina dig. (%)		0,762	0,850	0,929	1,011
Isoleucina (%)		0,708	0,732	0,745	0,762

¹ Contendo por kg: 12000 UI de Vit A; 2250 UI de Vit D₃; 27mg de Vit E; 3mg de Vit K; 2,25mg de Tiamina; 6mg de Riboflavina; 2,25mg de Piridoxina; 27 mcg de B₁₂; 400mcg de Ácido fólico; 150mcg de Biotina; 22,5mg de Ácido pantotênico e 45mg de Niacina;

² Contendo por kg: 88mg de Fe; 15mg de Cu; 80mg de Zn; 45mg de Mn; 1mg de I e 300mcg de Se.

³ Segundo Rostagno et al. (2005)

Aos 21 dias de idade os animais foram desmamados, pesados e transferidos para a creche totalmente fechada, sendo alojados em gaiolas metálicas com 1,60 m de comprimento x 1,0 m de largura, suspensas à altura de 0,56 m do chão, com pisos e laterais telados, dotadas de comedouros semi-automáticos e bebedouros tipo chupeta, localizadas em um prédio de alvenaria com piso de concreto e teto de madeira rebaixado. O aquecimento do ambiente foi feito através de lâmpadas incandescentes. A renovação de ar foi realizada quatro vezes ao dia somente no momento dos tratamentos, quando a porta da sala ficava aberta por uma hora.

Os leitões foram alojados individualmente em gaiolas de creche que permitiam contato visual entre eles.

Os leitões foram criados em condições de desafio sanitário. O desafio sanitário consistiu no alojamento dos leitões em uma sala de creche que estava ocupada com animais mais velhos e que não foi limpa e nem desinfetada.

Os leitões que tiveram diarreias foram medicados com uma dose diária injetável no músculo de 1 ml de antibiótico (princípio ativo - enrofloxacina), sendo adotado como critério para avaliação do índice de diarreia o seguinte: se um mesmo animal apresentasse diarreia por mais de um dia ele receberia a cada dia uma dose de antibiótico e o número total de doses foi considerado índice de diarreia.

Para avaliação do desempenho foram utilizadas as variáveis: ganho de peso total (GP) e conversão alimentar (CA). Os animais foram pesados ao início e ao final do período experimental.

Ao final do experimento 4 animais foram abatidos por dessensibilização cerebral e posterior sangramento para coleta de conteúdo intestinal.

Para contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Escherichia coli* a ingesta foi coletada à 30 cm da alça ileal. O conteúdo intestinal de leitões recém sacrificados foi coletado e armazenado em potes plásticos estéreis que foram acomodados dentro de uma bolsa térmica contendo gelo. Após as coletas as amostras foram encaminhadas para um laboratório de análise microbiológicas que realizaram a contagem de UFC de *E. coli* da seguinte forma: 1) as amostras foram homogeneizadas por inversão de pontas e o conteúdo drenado para um bécker após a lavagem das mucosas com cinco ml de água destilada; 2) as amostras foram preparadas após a pesagem do conteúdo coletado e retiradas uma alíquota de 1 ml que foi diluído em 10 ml de água destilada e a partir desta diluição foram realizadas diluições de até 1:10.000.000 de forma a viabilizar as contagens; 3) o plaqueamento foi realizado inoculando-se 1 ml da última diluição em placas de meio de cultura específico contendo alfa ou beta amilase incubadas a 35° C por 24 horas e após este período foram realizadas as contagens de *E. coli*; 4) a amostra foi removida para um cadinho identificado e tarado para pesagem e determinação da matéria seca seguindo-se a técnica descrita por Bellaver et al. (2002), sendo que os resultados foram expressos em log₁₀ de UFC por grama (g) de matéria seca.

Também se coletou amostras de parede intestinal em três locais diferentes do intestino delgado para análise de altura de vilosidades e profundidade de cripta.

O intestino delgado foi dissecado em sessões transversais de dois centímetros no duodeno, no jejuno e no íleo conforme descrito por Nickel et al.,(1973). As amostras foram imersas em solução fixadora (solução de *Bouin*) por 24 horas e em seguida lavadas e transferidas para a solução de álcool etílico a 70,0%. Após desidratação dos segmentos intestinais, eles foram recortados em fragmentos de cerca

de 1 cm, diafanizados em benzol e incluídos em parafina. Utilizando-se um micrótomo, foram produzidas seções com 7 µm de espessura, as quais foram coletadas de modo que, entre uma seção e a subsequente sejam eliminadas 30. As amostras foram coloridas por hematoxilina e eosina seguindo-se a técnica de Teixeira (1999). As lâminas contendo os cortes histológicos foram preparadas no laboratório de Histologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. As medidas de altura de vilosidade foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, através de analisador de imagem “Imagepro Plus 1.3.2” (1994) e microscópio óptico. Para cada lâmina foram feitas 30 medidas de vilosidades.

Os dados de GP e CA foram submetidos à análise de variância e regressão, utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000). As estimativas de exigência de plasma sanguíneo foram determinadas por análise de regressões utilizando o modelo linear ou quadrático, conforme o melhor ajustamento obtido para cada variável.

Os resultados de colônias de *E. coli* foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet a 10,0% utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000). Os dados referentes à microbiologia intestinal, originalmente em ufc/g (unidades formadoras de colônias/g de amostra) foram transformados pela função $y = \log x$, em que x é o número de unidades formadoras de colônias/g (ufc/g).

Foram realizadas análises descritivas visando-se relacionar a ocorrência de diarreia com o número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*.

Os dados referentes à altura de vilosidades foram comparados pelo teste, ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000).

Foram realizadas análises descritivas visando-se relacionar a ocorrência de diarreia com o número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados de peso inicial (PI) e os resultados relativos ao consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID) e unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) dos animais desmamados aos 21 dias de idade encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Peso inicial (PI), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID) e unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) dos animais desmamados aos 21 dias de idade.

Parâmetros	Níveis de plasma (%)				CV (%)
	0	2,5	5	7,5	
PI, kg	6,85	6,75	6,78	6,58	-
CR, kg	3,79	3,79	3,79	3,79	-
GP, kg	2,03	2,41	2,41	2,72	42,06
CA	1,87	1,57	1,57	1,39	36,67
ID	5	9	9	4	-
UFC, g/ml	3,87x10 ⁹ c	5,63x10 ⁷ b	1,03x10 ⁶ a	0,71x10 ⁶ a	53,5

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunnet a 10,0%.

Não foram constatadas diferenças significativas ($P \geq 0,10$) no ganho de peso dos animais em função dos tratamentos. Observou-se efeito linear decrescente ($P \leq 0,10$) dos tratamentos sobre a CA dos leitões desmamados aos 21 dias de idade. Os

animais submetidos ao tratamento 4 (7,5% de incorporação de plasma sanguíneo na ração) apresentaram menores valores de conversão alimentar e de colônias de *E. coli* menores que os animais dos demais tratamentos e os animais que receberam rações com plasma sanguíneo tiveram melhores desempenhos e menores quantidades de *E. coli* que aqueles do tratamento um, que receberam rações sem plasma.

Foi possível constatar que os leitões que receberam ração sem plasma tiveram maiores perdas de peso e piores conversões alimentares que aqueles que receberam ração com plasma. Dois animais de cada tratamento tiveram diarreias, porém para o controle da diarreia nos animais do tratamento quatro foi necessário apenas uma dose em um único dia enquanto que para os animais do tratamento 1 e 2 foram necessárias duas ou três doses em dois ou três dias para o controle da diarreia. Além disso, ao se comparar os resultados dos animais submetidos ao tratamento um (ração sem plasma) com os dos animais submetidos ao tratamento dois (rações com 2,5% de plasma) pode-se verificar que, em ambos, dois animais tiveram diarreias persistentes por até três dias, no entanto os animais do tratamento dois tiveram prejuízos menores do que os animais do tratamento um.

Segundo Gatnau et al., (1994) não se conhece ao certo o modo de ação do plasma sanguíneo e nem seus possíveis efeitos sobre a imunidade e consumo de alimento pelos leitões e eles sugeriram que novos fatores pudessem estar envolvidos. Eles também constataram que há efeitos benéficos do plasma sanguíneo sobre a conservação das estruturas intestinais e indícios de que o plasma sanguíneo poderia afetar a resposta hormonal (via ACTH) e conseqüentemente se evitar infecções com *E. coli*.

Conforme supracitado, uma das possibilidades de ação do plasma seria sua atividade contra a enterotoxemia induzida por *E. coli*. Deprez et al. (1996) obtiveram uma diminuição no número de *E.coli* nas fezes de suínos que receberam dietas suplementadas com plasma animal diante de uma infecção provocada. Estes autores justificaram esta diminuição do conteúdo desta bactéria devido à capacidade das glicoproteínas do plasma em atuar como núcleos de enlace nas fibrilas da *E. coli*, o que poderia reduzir sua anexação aos enterócitos.

Constatou-se que houve uma relação direta entre a quantidade de colônias de *E. coli* com a ocorrência de diarreias, redução do ganho de peso e piora da conversão alimentar dos leitões. A inclusão crescente de plasma reduziu linearmente ($P<0,10$) a incidência de colônias de *E. coli* e aumentou linearmente ($P<0,01$) o ganho de peso em leitões desmamados aos 21 dias de idade.

Diversos autores associam a melhora no desempenho dos leitões desmamados precocemente e alimentados com dietas à base de plasma sanguíneo em pó ao aumento de consumo pelos animais (Coffey e Cromwell, 2001; Van Dijk et al., 2001). Tem sido demonstrado, portanto, que o plasma atua de certa forma, modulando a ingestão de alimentos, com efeitos estimulantes ao consumo das dietas por leitões desmamados aos 21 dias de idade, em níveis de inclusão de pelo menos 5,0% deste alimento (Dritz et al., 1993, Campbell et al., 1998 e Kats et al., 1994a,b).

Entretanto, tem-se atribuído, também, ao plasma sanguíneo, a capacidade de ativação de sistema imune do leitão na primeira semana após o desmame aos 21 dias de idade (Gatnau e Zimmerman, 1990; Gatnau et al., 1993 e Zhao et al., 2007). Estes autores ligaram este atributo de ativação do sistema imune ao plasma sanguíneo devido às imunoglobulinas ativas que ele possui. Porém, há que se considerar que, o plasma

sanguíneo (por ser fonte protéica) é degradado no intestino delgado, o que poderia inviabilizar a sua função de ativador de sistema imune, e ainda que, se o plasma for heterólogo (ou, seja de outra espécie que não a suína), as suas imunoglobulinas podem não ter eficiência para exercer esta função. Assim é possível que os seus efeitos sejam locais e de ação direta, ou seja, no próprio intestino delgado, sobre as vilosidades intestinais ou sobre o controle da colonização de estirpes patogênicas de *Escherichia coli* no intestino delgado.

No presente experimento o fator “ingestão de alimentos” foi isolado e a mesma quantidade de ração foi fornecida aos animais, abrindo margem para que efeitos benéficos do plasma se pronunciassem em detrimento do consumo.

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que a inclusão de plasma sanguíneo em pó nas dietas de leitões desmamados em diferentes idades e conseqüente redução do número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) de *E. coli* teve ação direta sobre o desempenho dos leitões. Tal melhora vem de encontro ao descrito por diversos autores (Gatnau e Zimmermann, 1994; Bosi et al., 2001; Coffey e Cromwell, 2001; Van Dijk et al., 2001a,b).

Uma das hipóteses é de que o plasma sanguíneo na dieta, por meio do controle da proliferação bacteriana, reduziu a ocorrência de processos inflamatórios e conseqüentemente diminuição do desvio de energia que seria utilizada para o crescimento para a manutenção do sistema imune ativado.

Muco e pelo epitélio são a barreira entre as células epiteliais e o ambiente composto pela ingestão e a microbiota. Tais elementos participam diretamente dos processos de digestão e absorção de nutrientes, além de evitar danos causados por toxinas e microorganismos patogênicos. No momento do desmame, o animal ainda

imaturo no que tange seu complexo enzimático, se depara com mudanças bruscas na composição da sua dieta, o que pode afetar a integridade intestinal tanto na composição bacteriana quanto em sua integridade física.

O excesso de nutrientes não digeridos e não absorvidos e, dessa forma, altamente suscetíveis à fermentação pela microbiota intestinal, pode levar a alterações de pH com conseqüente ploriferação de bactérias indesejáveis como a *E. coli*, além de inflamações e ativação do sistema imune.

O plasma mostrou-se, portanto, como potente regulador da ação de bactérias indesejáveis, neste caso a *E. coli*. Novamente, tal ação se dá pela redução da adesão desses microorganismos patogênicos à mucosa devido às glicoproteínas presentes no plasma, que atuam como núcleos de enlace nas fibrilas da *E. coli* (Sanchez et al., 1993).

Tal justificativa vem de encontro ao observado por Bosi et al. (2004), que relatam que animais desmamados precocemente recebendo dietas suplementadas com plasma sanguíneo em pó quando desafiados por *E. coli* apresentaram reduzido processo inflamatório, como indicado pela melhora do desempenho, diminuição da secreção de IgA, menor dano à mucosa intestinal e diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no intestino. Resultados semelhantes foram observados por Moretó et al. (2008), Pérez-Bosque et al. (2006), Pérez-Bosque et al. (2008) e Moretó et al. (2009). Touchette et al. (2002) também afirmam que o plasma aparece como fator de regulação de processos inflamatórios.

Stein (2007) levanta que as proteínas plasmáticas têm outras funções além do fornecimento de aminoácidos para síntese muscular, melhorando o status imunológico de leitões desmamados (Stein, 2007). Alguns autores afirmam que a inclusão de plasma

sanguíneo em pó nas dietas de creche pode atuar dessa forma (Touchette et al., 2002; Bosi et al., 2004), reduzindo a susceptibilidade dos animais a infecções por *E. coli* (Bosi et al., 2001; Van Dijk et al., 2002, Owusu-Asiedu et al., 2003).

Touchetté et al. (2002) realizaram um estudo com 20 leitões desmamados aos 14 dias de idade para se avaliar os efeitos do plasma sobre as respostas do sistema imune dos leitões desafiados com lipopolissacarídeos. Os animais receberam dietas com 0% e 7% de inclusão de plasma durante uma semana pós-desmame. A inclusão dietética de plasma resultou em reduzida expressão do mRNA do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e da interleucina-1 β (IL-1 β) na glândula adrenal, baço, hipotálamo, hipófise e fígado. Ainda, que a expressão do mRNA da IL-6 foi reduzida no baço e na hipófise dos animais alimentados com dietas à base de plasma sanguíneo em pó.

Estes resultados demonstram que a ativação do sistema imune é menor em leitões alimentados com dietas contendo plasma sanguíneo em pó quando comparados aos animais que não receberam o plasma (Touchetté et al., 2002).

Diante de tais justificativas é possível afirmar que a melhora de desempenho proporcionada pela inclusão de plasma sanguíneo nas dietas, relatada em diversos estudos, que demonstram melhorias de até 25% no ganho diário médio de leitões recebendo plasma nas duas primeiras semanas pós-desmame (Coffey e Cromwell, 2001; Van Dijk et al., 2001; Barbosa et al., 2007; Gattás et al., 2008), não se dá única e exclusivamente pelo aumento de consumo.

Os resultados relativos à altura de vilosidades (AV) e profundidade de criptas (PC) dos animais desmamados aos 21 dias de idade encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Altura de vilosidades e profundidade de cripta dos diferentes segmentos do ID (duodeno, jejuno e íleo) e altura média de altura de vilosidades e profundidade de cripta no intestino delgado de leitões desmamados aos 21 dias de idade.

Altura de vilosidades, μm	Tratamentos				CV (%)
	1	2	3	4	
Duodeno	222	370	386	464	35,56
Jejuno	372	380	454	380	33,62
Íleo	380	280	382	441	31,82
Média	325	343	407	428	19,40
Profundidade de cripta, μm					
Duodeno	280	277	293	283	33,07
Jejuno	262	363	359	380	21,80
Íleo	267	323	497	437	28,83
Média	270	321	383	367	20,48

Não se observou efeito ($P>0,05$) sobre altura de vilosidades (AV) e profundidade de criptas (PC) dos animais desmamados aos 21 dias de idade. Tais resultados indicam que o plasma pode não apresentar efeitos tróficos específicos no intestino delgado, o que vem corroborar com o observado por diversos autores (Jiang et al., 2000; Van Dijk, et al., 2002). Zhao et al. (2007) avaliando o efeito da inclusão de 6% de plasma nas dietas de leitões desmamados aos 18 dias de idade também não observaram efeito benéfico sobre a morfologia intestinal dos animais.

Por outro lado, alguns autores mostram que o plasma afeta de forma benéfica a morfologia intestinal de leitões. Yi et al. (2005), trabalhando com animais desmamados aos 17 dias de idade, verificaram maiores alturas de vilosidades nas porções proximal e média do jejuno e também no íleo dos leitões que receberam dieta com plasma. Bosi et al. (2004) relatam que a inclusão de plasma nas dietas pós-desmame ajudam na manutenção da integridade da mucosa intestinal, levando à melhora no desempenho

dos animais desafiados com *E. coli* K88+-. É provável que os efeitos benéficos observados por esses autores estejam ligados aos fatores de crescimento epidermal e às IGF e que sejam estes tróficos às vilosidades do intestino delgado de leitões. No presente estudo, no entanto, não se pode fazer tal correlação.

4. CONCLUSÃO

O plasma sangüíneo tem efeitos diretos sobre a colonização de *E.coli* no intestino delgado. A inclusão crescente de plasma reduziu linearmente ($P<0,10$) a incidência de colônias de *E. coli* e aumentou linearmente ($P<0,01$) o ganho de peso em leitões desmamados aos 21 dias de idade. O plasma sangüíneo ($P>0,05$) em pó não teve efeitos sobre a altura de vilosidade e a profundidade de cripta dos leitões desmamados aos 21 dias de idade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, F.F.; FERREIRA, A.S.; SILVA, F.C.O. et al Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**. V.36, n.4, p.1052-1060 .2007 (supl).

BELLAVER, C., COSTA, C.A.F., MACHADO, H.G.P., LIMA, G.J.M.M. Modelo experimental para pesquisa e desenvolvimento de aditivos alternativos para frangos de corte. Comunicado técnico nº 315. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves. 2002.

BERTOL, T. M.; JORGE, N. M.; LUDKE, V.; FRANKE, M. R. Proteínas da Soja Processadas de Diferentes Modos em Dietas para Desmame de Leitões. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**. V.30, n.1, p.150-157, 2001.

BOSI, P.; HAN, I. K.; JUNG, H. J. et al. Effect of different spray dried plasmas on growth, ileal digestibility, nutrient deposition, immunity and health of early weaned pigs challenged with E. coli K88. **Asian-Aus. J. Anim. Sci.**, v.14, p.1138–1143, 2001.

BOSI, P. et al. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic Escherichia coli K88. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.1764–1772, 2004.

CAMPBELL, J. M. et al. The use of plasma and blood cells in swine feeds In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E MANEJO DE LEITÕES, 1998 Campinas, **Anais...**Campinas: CBNA,1998. p.18-32.

- CAMPBELL, J. M.; QUIGLEY III, J. D.; RUSSELL, L. E. e KOEHNK, L. D.. Efficacy of spray-dried bovine serum on health and performance of turkeys challenged with *Pasteurella multocida*. **J. Appl. Poult. Res.**, v.13, p.388–393, 2004.
- COFFEY, R. D., e CROMWELL, G. L. Use of spray-dried animal plasma in diets for weanling pigs. **Pig News Inf.**, v.22, p.39–48, 2001.
- DEPRÉZ, P et al. The use plasma components as adhesin inhibitors in the protection of piglets against *Escherichia coli* enterotoxemia. In: IPVS Congress. **Anais...** Bolonia, Italia, p. 276, 1996.
- DRITZ, S. S.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D. et al. Optimum level of spray dried porcine plasma for early weaned (10,5 d of age) starter pigs. **Swine day**. Kansas State University. 1993.
- GATNAU, R.; CAIN. C.; DREW, M. et al. Mode of action of spray-dried porcine plasma in weaning pig. *J. Anim. Sci.*, v.72, suppl. 1, p. 82. 1995.
- GATTÁS, G. et al. Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 14 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.37, n.2, p.278-285, 2008.
- KATS, L.J., NELSEN, J.L., TOKACH, M.D. et al. The effects of spray-dried blood meal on growth performance of the early-weaned pig. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2860-2869, 1994a.

KATS, L.J., NELSEN, J.L., TOKACH, M.D. et al. The effect of spray-dried porcine plasma on growth performance in the early-weaned pig. **Journal of Animal Science**, v.72, n.8, p.2075-2081, 1994b.

MORETÓ, M.; MIRÓ, L.; POLO, J. et al. Oral porcine plasma proteins prevent the release of mucosal pro-inflammatory cytokines in rats challenged with *S. aureus* enterotoxin B. **Digestive Disease Week**, San Diego, CA, May 17–22, 2008.

MORETÓ, M. e PÉREZ-BOSQUE, A. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. **Journal of Animal Science**, v. 87, p.92-100, 2009.

OWUSU-ASIEDU, A., C.; NYACHOTI, M. e MARQUARDT, R. R. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichiacoli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1790–1798, 2003.

PÉREZ-BOSQUE, A., C.; AMAT, J.; POLO, J.; CAMPBELL, M.; CRENSHAW, J.; RUSSELL, L. e MORETÓ, M. Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. **J. Nutr.**, v.136, p.2838– 2843, 2006.

PÉREZ-BOSQUE, A.; MIRÓ, L.; POLO, J.; RUSSELL, L.; CAMPBELL, J.; WEAVER, E.; CRENSHAW, J. e MORETÓ, M. Dietary plasma proteins modulate the immune response of diffuse gut-associated lymphoid tissue in rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. **J. Nutr.**, v.138, p.533–537, 2008.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**: Viçosa, MG:UFV, 2005. 186p.

SANCHEZ, R., L. et al. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* cells expressing F17 fimbriae to small intestinal mucus and brush-border membranes of young calves. **Microb. Pathog.**, v.15, p.207–219, 1993.

STEIN, H. Feeding the pigs' immune system and alternatives to antibiotics. **In:** London Swine Conference – Today's Challenges... Tomorrow's Opportunities Londres, Inglaterra, 2007.

TOUCHETTE, K.J.; CARROL, J.A.; ALLEE, G.L. et al. Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I Effects on the immune axis of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.80, n.494, p. 494-501, 2002.

VAN DIJK, A. J.; EVERTS, H.; NABUURS, M. J. A. et al. Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: A review. **Livest. Prod. Sci.**, v.68, p.263–274, 2001.

VAN DIJK, A. J.; NIEWOLD, T. A.; NABUURS, M. J. et al. Small intestinal morphology and disaccharidase activities in early-weaned piglets fed a diet containing spraydried porcine plasma. **J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.49, p.81–86, 2002.

YI, G. F.; CARROLL, J. A.; ALLEE, G. L.; GAINES, A. M.; KENDALL, D. C.; USRY, J. L.; TORIDE, Y. e IZURU, S. Effect of glutamine and spray-dried plasma on

growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of Escherichia coli K88+-challenged weaned pigs. **J Anim Sci**, v.83, p. 634-643. 2005.

ZHAO, J. et al. Growth performance and intestinal morphology responses in early pigs to supplementations of antibiotic-free diets with an organic copper complex and spray-dried plasma protein in sanitary and no sanitary environments. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 1302-1310, 2007.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DO PLASMA SANGUÍNEO SOBRE O DESENVOLVIMENTO BACTERIANO E ESTRUTURA INTESTINAIS DE LEITÕES DESMAMADOS AOS 28 DIAS DE IDADE.

Resumo: Visando-se determinar se o plasma sanguíneo tem outros efeitos sobre leitões desmamados aos 28 dias de idade que não sejam apenas aumento da quantidade de ração consumida, foram utilizados 24 leitões desmamados aos 28 dias de idade em um experimento com delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (rações com 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5% de plasma sanguíneo), seis repetições e um animal por unidade experimental. Não foram constatadas diferenças entre os tratamentos em relação às conversões alimentares, mas foram em relação aos ganhos de peso e às quantidades de colônias de *E. coli*. Os animais que consumiram as dietas com plasma sanguíneo apresentaram maiores ganhos de peso e menores quantidades de *E. coli* no intestino delgado do que os animais que receberam dietas sem plasma. Não se observou melhorias dos parâmetros intestinais avaliados diante da suplementação de plasma. Concluiu-se que a inclusão de 2,5% de plasma sanguíneo em pó reduziu a incidência de colônias de *E. coli* em leitões desmamados aos 28 dias de idade criados em condições de desafio.

Palavras-chave: desmame precoce, diarreias, *Escherichia coli*, idade ao desmame

EFFECTS OF SPRAY DRIED PLASMA ON WALL STRUCTURE AND MICROBIOLOGICAL DEVELOPMENT IN THE GUT OF PIGLETS WEANED AT 28 DAYS OF AGE.

Abstract: Aiming to determining whether the plasma has other effects on 28 days of age weaned piglets that are not only related with feed intake increased, 24 piglets were used in an experiment with randomized blocks design with four treatments (diets with 0.0, 2.5, 5.0 and 7.5% of blood plasma), six repetitions and one animal experimental unit. No differences were found between treatments by feed/gain ration and weight, gain but significant differences were found with regard to the *E. coli* colonies amounts. The animals submitted to diets containing plasma showed lower amounts of *E. coli* in the small intestine than those animals feeding diets without plasma. There were not beneficial effects on villus height or crypt depth. In conclusion, the inclusion of 2.5% of spray dried plasma in the diets reduced the occurrence of *E. coli* colonies in the small intestine of piglets weaned at 28 days of age but did not affect the performance at 28 days weaned when created in challenge conditions.

Keywords: diarrhea, early weaning, *Escherichia coli*, performance

1. INTRODUÇÃO

Têm-se atribuído ao plasma sanguíneo, efeitos estimulantes na ingestão de dietas (Ermer et al., 1994 e Campbel et al., 2003; Thomaz et al., 2009). Entretanto, devem-se considerar aspectos relacionados com a saúde do leitão no momento do desmame.

Têm-se observado que o leitão não é capaz de produzir sua própria atividade imunológica em quantidades adequadas antes dos 42 dias de idade. Portanto, qualquer estresse, problema digestivo, de manejo ou destes fatores combinados, podem fazer com que o sistema de defesa do animal seja ativado para neutralizá-los antes que estes possam colocar em perigo a vida dos leitões. A ativação do sistema imune pode afetar os processos metabólicos e o crescimento, pela interação com o sistema nervoso central; pela interação com sistema endócrino mediante a liberação de corticosteróides e tiroxina e pela interação com sistema endócrino mediante liberação de citocinas (peptídeos imunoreguladores) pelos leucócitos (Klasing et al. 1991).

Ao plasma tem-se atribuído a capacidade de estimular a resposta imune dos leitões (Gatnau et al., 1993), em até duas semanas após o desmame aos 21 dias de idade (Coffey e Cromwell, 2001; Van Dijk et al., 2001; Barbosa et al., 2007; Gattás et al., 2008). Alguns autores têm sugerido que as respostas positivas podem resultar da presença de imunoglobulinas específicas no plasma (Gatnau et al., 1995; Owen et al., 1995; Weaver et al., 1995) que podem diminuir os efeitos adversos à proliferação bacteriana, como a ocorrência de diarreias e alterações na ultra-estrutura de vilosidades no intestino dos animais.

Entretanto com leitões desmamados aos 28 dias ou mais não se tem observado efeitos do plasma sanguíneo sobre a estrutura intestinal e sobre a ocorrência de diarreias e apenas em alguns experimentos têm-se evidenciado efeitos sobre o

desempenho dos animais. Provavelmente estes efeitos não sejam evidenciados devido às condições de desafio do ambiente em que são criados estes animais.

Assim, verificou-se a necessidade de se estudar se há efeitos benéficos do plasma sobre a ultra-estrutura intestinal e também se há redução do número de unidades formadoras de colônias de *E. coli* com conseqüente melhora no desempenho de leitões desmamados aos 28 dias de idade, independentemente do consumo de ração.

2. MATERIAIS E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, no período de julho a outubro de 2007.

Foram utilizados 24 leitões desmamados aos 28 dias de idade distribuídos em delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos, quatro repetições e um animal por unidade experimental. O critério para formação dos blocos foi o peso do animal ao desmame. Os tratamentos usados foram rações com 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5% de inclusão de plasma sangüíneo.

Foram usados os teores de proteína bruta e energia digestível, bem como os níveis mínimos de cálcio, fósforo total e fósforo disponível, das dietas experimentais conforme preconizado em Rostagno et al. (2005) e a relação cálcio:fósforo total foi mantida em 1,35 em todas as dietas experimentais.

Os tratamentos foram dietas contendo milho e farelo de soja lactose, óleo, fosfato bicálcico, calcário, sal, premix de vitaminas e premix de minerais, sendo que: no tratamento um, sem plasma, foi utilizado como fonte protéica o leite desnatado em pó,

nos tratamentos dois e três foi utilizado como fonte protéica uma combinação de plasma sanguíneo em pó com leite desnatado em pó e no Tratamento 4 foi utilizado o plasma sanguíneo em pó como fonte protéica.

Lactose foi adicionada às dietas de forma a se garantir um nível próximo de 12,0% deste carboidrato em todas. Além disso, foram adicionados os aminoácidos lisina, metionina e treonina nas dietas experimentais de forma a se garantir que todas mantivessem o mesmo perfil em aminoácidos digestíveis de acordo com o conceito de proteína ideal. As relações entre os aminoácidos metionina e lisina, treonina e lisina, e triptofano e lisina seguiram o preconizado por Rostagno et al. (2005).

As composições centesimais e calculadas dos tratamentos encontram-se apresentadas na Tabela 5.

As dietas foram umidificadas e fornecidas aos animais de forma controlada em quantidades variáveis em quatro refeições diárias por um período de uma hora por trato, por doze dias. A quantidade de ração fornecida foi em função do consumo dos animais do tratamento um. Em testes anteriores determinou-se o consumo de ração inicial dos animais desmamados aos 28 dias de idade recebendo a dieta do tratamento um. As sobras de ração foram secas e pesadas e quantidades iguais foram fornecidas na refeição seguinte, de modo a se assegurar consumos iguais por repetição.

Tabela 5. Composições centesimais e calculadas das rações experimentais.

<i>Composição centesimal</i>	Ingredientes	Níveis de plasma (%)			
		0	2,5	5,0	7,5
Milho		49,94	49,51	49,65	49,30
Farelo de Soja		25,70	25,70	25,70	25,70
Leite em pó		16,20	11,90	5,50	-----
Lactose		2,33	4,96	8,88	12,20
Plasma SP		-----	2,50	5,00	7,50
Óleo de Soja		2,42	1,82	1,46	1,18
Fosfato Bicálcico		1,60	1,75	1,92	2,07
Calcário		0,70	0,70	0,71	0,85
Sal		0,35	0,35	0,35	0,35
Premix Vitamínico ¹		0,15	0,15	0,15	0,15
Premix Mineral ²		0,10	0,10	0,10	0,10
L-Lisina HCL (98%)		0,231	0,256	0,285	0,293
DL-Metionina (98%)		0,152	0,168	0,176	0,182
L-Treonina (98%)		0,128	0,131	0,123	0,125
<i>Composição calculada³</i>					
ED (Kcal/Kg)		3500	3500	3500	3500
Proteína bruta (%)		21,20	21,53	21,20	21,13
Ca (%)		0,886	0,892	0,882	0,891
Ptotal(%)		0,652	0,661	0,658	0,660
Pdig (%)		0,482	0,491	0,488	0,490
Na (%)		0,270	0,274	0,280	0,280
Lisina dig. (%)		1,450	1,470	1,476	1,511
Treonina dig. (%)		0,913	0,926	0,930	0,952
Triptofano dig. (%)		0,247	0,250	0,251	0,257
Met+Cis dig. (%)		0,812	0,823	0,826	0,846
Arginina dig. (%)		1,055	1,134	1,206	1,280
Valina dig. (%)		0,762	0,850	0,929	1,011
Isoleucina (%)		0,708	0,732	0,745	0,762

¹ Contendo por kg: 12000 UI de Vit A; 2250 UI de Vit D₃; 27mg de Vit E; 3mg de Vit K; 2,25mg de Tiamina; 6mg de Riboflavina; 2,25mg de Piridoxina; 27 mcg de B₁₂; 400mcg de Ácido fólico; 150mcg de Biotina; 22,5mg de Ácido pantotênico e 45mg de Niacina;

² Contendo por kg: 88mg de Fe; 15mg de Cu; 80mg de Zn; 45mg de Mn; 1mg de I e 300mcg de Se.

³ Segundo Rostagno et al. (2005)

Aos 28 dias de idade os animais foram desmamados, pesados e transferidos para a creche totalmente fechada, sendo alojados em gaiolas metálicas com 1,60 m de comprimento x 1,0 m de largura, suspensas à altura de 0,56 m do chão, com pisos e laterais telados, dotadas de comedouros semi-automáticos e bebedouros tipo chupeta, localizadas em um prédio de alvenaria com piso de concreto e teto de madeira rebaixado. O aquecimento do ambiente foi feito através de lâmpadas incandescentes. A renovação de ar foi realizada quatro vezes ao dia somente no momento dos tratamentos, quando a porta da sala ficava aberta por uma hora.

Os leitões, um de cada leitegada por tratamento, foram alojados individualmente em gaiolas de creche que permitiam contato visual entre eles. Os leitões foram criados em condições de desafio sanitário. O desafio sanitário consistiu no alojamento dos leitões em uma sala de creche que estava ocupada com animais mais velhos e que não foi limpa e nem desinfetada.

Os leitões que manifestaram diarreias foram medicados com uma dose diária injetável no músculo de 1 ml de antibiótico (princípio ativo enrofloxacina), sendo adotado como critério para avaliação do índice de diarreia o seguinte: se um mesmo animal apresentasse diarreia por mais de um dia ele receberia a cada dia uma dose e o número total de doses seria considerado índice de diarreia.

Ao final do experimento os animais foram abatidos por dessensibilização cerebral e posterior sangramento para coleta de conteúdo intestinal. Para contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Escherichia coli* a ingesta foi coletada à 30 cm da alça ileal para.

O conteúdo intestinal de leitões recém sacrificados foi coletado e armazenado em potes plásticos estéreis que foram acomodados dentro de uma bolsa térmica contendo gelo. Após as coletas as amostras foram encaminhadas para um laboratório de análise microbiológicas que realizaram a contagem de UFC de *E. coli* da seguinte forma: 1) as amostras foram homogeneizadas por inversão de pontas e o conteúdo drenado para um bécker após a lavagem das mucosas com cinco ml de água destilada; 2) as amostras foram preparadas após a pesagem do conteúdo coletado e retiradas uma alíquota de 1 ml que foi diluído em 10 ml de água destilada e a partir desta diluição foram realizadas diluições de até 1:10.000.000 de forma a viabilizar as contagens; 3) o plaqueamento foi realizado inoculando-se 1 ml da última diluição em placas de meio de cultura específico contendo alfa ou beta amilase incubadas a 35° C por 24 horas e após este período foram realizadas as contagens de *E. coli*; 4) a amostra foi removida para um cadinho identificado e tarado para pesagem e determinação da matéria seca seguindo-se a técnica descrita por Bellaver et al. (2002), sendo que os resultados foram expressos em log₁₀ de UFC por grama (g) de matéria seca.

Também se coletou ao final do experimento amostras de parede intestinal em três locais diferentes do intestino delgado para análise de altura de vilosidades e profundidade de cripta.

O intestino delgado foi dissecado em sessões transversais de dois centímetros no duodeno, no jejuno e no íleo conforme descrito por Nickel et al.,(1973). As amostras foram imersas em solução fixadora (solução de *Bouin*) por 24 horas e em seguida lavadas e transferidas para a solução de álcool etílico a 70,0%. Após desidratação dos segmentos intestinais, eles foram recortados em fragmentos de cerca de 1 cm, diafanizados em benzol e incluídos em parafina. Utilizando-se um micrótomo,

foram produzidas seções com 7 µm de espessura, as quais foram coletadas de modo que, entre uma seção e a subsequente sejam eliminadas 30. As amostras foram coloridas por hematoxilina e eosina seguindo-se a técnica de Teixeira (1999). As lâminas contendo os cortes histológicos foram preparadas no laboratório de Histologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. As medidas de altura de vilosidade foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, através de analisador de imagem “Imagepro Plus 1.3.2” (1994) e microscópio óptico. Para cada lâmina foram feitas 30 medidas de vilosidades.

Os dados de GP e CA foram submetidos à análise de variância e regressão, utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000). As estimativas de exigência de plasma sanguíneo foram determinadas por análise de regressões utilizando o modelo linear ou quadrático, conforme o melhor ajustamento obtido para cada variável.

Os resultados de colônias de *E. coli* foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet a 10,0% utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000). Os dados referentes à microbiologia intestinal, originalmente em ufc/g (unidades formadoras de colônias/g de amostra) foram transformados pela função $y = \log x$, em que x é o número de unidades formadoras de colônias/g (ufc/g).

Foram realizadas análises descritivas visando-se relacionar a ocorrência de diarreia com o número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*.

Os dados referentes à altura de vilosidades foram comparados pelo teste, ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000).

Foram realizadas análises descritivas visando-se relacionar a ocorrência de diarreia com o número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados de peso inicial (PI) e os resultados relativos ao consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID) e unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) dos animais desmamados aos 28 dias de idade encontram-se apresentados na Tabela 6.

Não foram constatadas diferenças entre os tratamentos em relação às conversões alimentares e ganhos de peso, porém se constataram diferenças significativas ($P \leq 0,10$) com relação às quantidades de colônias de *E. coli*. Os animais submetidos às dietas contendo plasma sanguíneo apresentaram menores quantidades de *E. coli* no intestino delgado que os animais que receberam dietas sem plasma. Embora não analisado estatisticamente, constatou-se que a aplicação de dosagens de antibióticos nos animais submetidos a dietas sem plasma foi bem maior do que as dosagens aplicadas nos animais que receberam dietas contendo plasma. Como este foi um experimento realizado de forma contínua no mesmo ambiente em que foram realizados dois outros que trataram do mesmo assunto com animais em idades de desmame diferentes, é possível que outros patógenos tenham surgido e interferido na expressão dos resultados dos animais. Nas amostras de conteúdo intestinal dos animais

deste experimento foram constatadas colônias de *Streptococcus sp.*, enquanto que nas amostras de conteúdo intestinal dos animais dos dois outros experimentos não foram.

Tabela 6. Peso inicial (PI), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID) e unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) dos animais desmamados aos 28 dias de idade.

Parâmetros	Níveis de plasma (%)				CV (%)
	0	2,5	5	7,5	
PI, kg	8,65	8,62	8,82	8,82	-
CR, kg	5,97	5,97	5,97	5,97	-
GP, kg	4,49	4,96	4,43	4,62	22,50
CA	1,38	1,23	1,35	1,29	21,57
ID	15	4	1	10	-
UFC, g/ml	8,9x10 ⁵ b	1,3x10 ⁵ a	7,9x10 ⁵ a	2,0x10 ⁵ a	34,6

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunnet a 10,0%.

Alguns autores sugerem que a melhora no desempenho de leitões alimentados com plasma se deve diretamente ao aumento do consumo de ração (Ermer et al., 1994). Outros sugerem que os benefícios do plasma podem ir além do simples estímulo ao consumo e serem resultado da presença de imunoglobulinas específicas (Gatnau et al., 1994; Owen et al., 1995; Weaver et al., 1995). Tal afirmativa é baseada em resultados de pesquisas que mostram que o ganho de peso e o consumo de ração de leitões recebendo plasma sanguíneo em pó são mais pronunciados quando os animais se encontram em ambientes desafiados, em comparação com animais mantidos em ambientes considerados limpos (Coffey e Cromwell, 1995).

Van der Peet-Schwering e Binnendijk (1995) observaram redução de patologias intestinais quando os animais receberam dietas com suplementação de plasma sanguíneo em pó. Por outro lado, Van Dijk et al. (2002) não observaram efeitos do

plasma sanguíneo em pó sobre a morfologia intestinal de suínos nem sobre o número de colônias bacterianas nas fezes.

Bosi et al. (2004) sugerem que os mecanismos pelos quais o plasma sanguíneo em pó reduz infecções patogênicas se dá pelo aumento da imunidade local e/ou redução da adesão de patógenos à mucosa devido às imunoglobulinas e glicoproteínas presentes neste ingrediente (atuando como núcleos de enlace nas fibrilas da *E. coli*).

Os efeitos descritos acima estariam associados de forma direta com a melhora do desempenho dos leitões. Uma desenfreada proliferação de microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli*, tem como consequência, diarreias. O animal debilitado ainda tem de desviar nutrientes para manutenção do sistema imune ativado. Ocorre, portanto, redução do ganho de peso. Bosi et al. (2004) relatam tal situação, devidamente comprovada pela observação do aumento de citocinas circulantes, indicando ativação do sistema imune.

No presente experimento, no entanto, constatou-se que houve uma relação direta entre a quantidade de colônias de *E. coli* com a ocorrência de diarreias, mas não com o desempenho dos animais. Tal resultado vem de encontro ao descrito por diversos autores (Gatnau e Zimmermann, 1994; Bosi et al., 2001; Coffey e Cromwell, 2001; Van Dijk et al., 2001). Os mesmo autores associaram, no entanto, a redução da quantidade de colônias de *E. coli* à melhora no desempenho dos animais, fato esse que não foi observado no presente estudo. Uma provável explicação se dá pelo fato de terem sido isolados colônias de *Streptococcus sp.* nas amostras de conteúdo intestinal dos leitões. É possível que os animais estivessem frente a outro tipo de desafio sanitário, o que pode de certa forma, ter mascarado as respostas sobre os dados de desempenho.

Os dados de altura de vilosidades no duodeno, jejuno e íleo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Altura de vilosidades e profundidade de criptas dos diferentes segmentos do ID (duodeno, jejuno e íleo) de leitões desmamados aos 28 dias de idade.

Altura de vilosidades, μm	Tratamentos				CV (%)
	1	2	3	4	
Duodeno	370	333	315	359	15,46
Jejuno	343	286	338	308	17,89
Íleo	282a	244a	339b	296a	14,17
Profundidade de cripta, μm					
Duodeno	301a	308a	275a	345b	7,98
Jejuno	282	295	298	321	10,03
Íleo	254	244	239	273	11,42

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunnet a 10,0%.

No presente estudo não foram observadas melhorias do plasma sanguíneo em pó sobre a altura de vilosidades de leitões desmamados aos 28 dias de idade.

Da mesma forma, Nofrarías et al., (2006) não observaram efeitos da inclusão de plasma sobre a altura de vilosidade e profundidade de cripta de leitões desmamados aos 20 dias, sugerindo que o plasma não tem efeitos tróficos específicos tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso, não evitando, portanto, danos causados à parede intestinal associado com o desmame.

Torrallardona et al. (2003), trabalhando com animais desmamados aos 24 dias de idade e desafiados com *Escherichia coli* K99 também não observaram melhora sobre os parâmetros avaliados (altura de vilosidade e profundidade de cripta no intestino delgado) diante da inclusão de 7% de plasma sanguíneo em pó nas dietas.

Em contrapartida, Yi et al. (2005) verificaram maiores alturas de vilosidades nas porções proximal e média do jejuno e também no íleo dos leitões que receberam

dieta com plasma. Neste trabalho, no entanto, os animais foram desmamados mais precocemente, aos 17 dias. Essa disparidade de resultados por indicar que os efeitos benéficos da inclusão do plasma nas dietas podem estar relacionados com a idade do animal ao desmame e, conseqüentemente, com o desenvolvimento de suas defesas e de seu sistema enzimático. Animais mais velhos podem apresentar-se mais adaptados a digerir alimentos de origem vegetal e assim estarem menos susceptíveis a injúrias à parede intestinal.

4. CONCLUSÃO

A inclusão de 2,5% de plasma sanguíneo em pó na dieta reduziu ($P < 0,10$) a incidência de colônias de *E. coli* em leitões desmamados aos 28 dias de idade, não afetando, no entanto, o desempenho dos animais. O plasma sanguíneo em pó não proporcionou melhorias sobre a altura de vilosidade do duodeno e do íleo de leitões desmamados aos 28 dias de idade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, F.F.; FERREIRA, A.S.; SILVA, F.C.O. et al Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**. V.36, n.4, p.1052-1060 .2007 (supl).

BELLAVER, C., COSTA, C.A.F., MACHADO, H.G.P., LIMA, G.J.M.M. Modelo experimental para pesquisa e desenvolvimento de aditivos alternativos para frangos de corte. Comunicado técnico nº 315. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves. 2002.

BOSI, P.; HAN, I. K.; JUNG, H. J. et al. Effect of different spray dried plasmas on growth, ileal digestibility, nutrient deposition, immunity and health of early weaned pigs challenged with E. coli K88. **Asian-Aus. J. Anim. Sci.**, v.14, p.1138–1143, 2001.

BOSI, P. et al. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic Escherichia coli K88. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.1764–1772, 2004.

CAMPBELL, J. M. et al. The use of plasma and blood cells in swine feeds In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E MANEJO DE LEITÕES, 1998 Campinas, **Anais...**Campinas: CBNA,1998. p.18-32.

CAMPBELL, J. M.; QUIGLEY III, J. D.; RUSSELL, L. E. e KOEHNK, L. D.. Efficacy of spray-dried bovine serum on health and performance of turkeys challenged with *Pasteurella multocida*. **J. Appl. Poult. Res.**, v.13, p.388–393, 2004.

COFFEY, R.D. e CROMWELL, G.L. The impact of environment and antimicrobial agents on the growth response of early-weaned pigs to spray-dried porcine plasma. **Journal of Animal Science**, v.73, n.9, p.2532-2539, 1995.

COFFEY, R. D., e CROMWELL, G. L. Use of spray-dried animal plasma in diets for weanling pigs. **Pig News Inf.**, v.22, p.39-48, 2001.

ERMER, P.M.; MILLER, P.S.; LEWIS, A.J. Diet preference and meal patterns of weanling pigs offered diets containing either spray-dried porcine plasma or dried skim milk. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1548-1554, 1994.

GATNAU, R. et al. Spray dried porcine plasma as an alternative ingredient in diets of weanling pigs. **Pig News and information**, v. 14, n. 4, p. 157-159, 1993.

GATNAU, R. e ZIMMERMAN, D. R. Effects of spray dried plasma of different sources and process on growth performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 166, 1994.

GATTÁS, G. et al. Níveis de plasma sanguíneo em pó em dietas para leitões desmamados aos 14 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.37, n.2, p.278-285, 2008.

KLASING, K. C.; JOHNSTONE, B. J. e BENSON, B. N. Implications on and immune response on growth and nutrient requirements of chicken. **Recent Advances in Animal Nutrition**. Eds.HARESIGN, W. e COLE, D. J. A. London, 135-146p. 1991.

NICKEL, R., SCHUMMER, A. e SEIFERLE, E. The Viscera of the Domestic Mammals. **Verlag Paul Parey**, Berlin, 1973.

NOFRARÍAS, M.; MANZANILLA, E. G.; PUJOLS, J. et al. Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p.2735–2742, 2006.

OWEN, K. Q.; NELSSSEN, J. L.; GOODBAND, R. D. et al. Effects of various fractions of spray-dried porcine plasma on performance of early-weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v.73 (Suppl.1):81 (Abstr.), 1995.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**: Viçosa, MG:UFV, 2005. 186p.

TEIXEIRA, A.O. **Efeito de dietas simples e complexas sobre a morfologia intestinal de leitões até 35 dias de idade**. Viçosa: UFV, 1999. 60P. Dissertação de Mestrado.Universidade Federal de Viçosa. 1999.

TORRALLARDONA, D.; CONDE, M. R.; BADIOLA, I.; POLO, J. e BRUFAU, J. Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K99. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1220–1226. 2003.

VAN DIJK, A. J.; EVERTS, H.; NABUURS, M. J. A. et al. Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: A review. **Livest. Prod. Sci.**, v.68, p.263–274, 2001.

WEAVER, E. M.; RUSSELL, L. A.; DREW, M. D. The effects of spray dried animal plasma fractions on performance of newly weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, 73:81 (Supl 1), 1995.

YI, G. F.; CARROLL, J. A.; ALLEE, G. L.; GAINES, A. M.; KENDALL, D. C.; USRY, J. L.; TORIDE, Y. e IZURU, S. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of Escherichia coli K88+-challenged weaned pigs. **J Anim Sci**, v.83, p. 634-643. 2005.

CAPÍTULO 4

EFEITOS DO PLASMA SANGÜÍNEO SOBRE A ESTRUTURA E O DESENVOLVIMENTO BACTERIANO INTESTINAIS DE LEITÕES DESMAMADOS AOS 35 DIAS DE IDADE.

Resumo: Visando-se determinar se o plasma sangüíneo tem outros efeitos sobre leitões desmamados aos 35 dias de idade que não seja apenas aumento da quantidade de ração consumida, foram utilizados 24 leitões desmamados aos 35 dias de idade em um experimento com delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (rações com 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5% de plasma sangüíneo), seis repetições e um animal por unidade experimental. Os animais submetidos às dietas contendo plasma sangüíneo apresentaram maiores ganhos de peso e menores quantidades de *E. coli* no intestino delgado que os animais que receberam dietas sem plasma. Embora não analisado estatisticamente, constatou-se que a aplicação de dosagens de antibióticos nos animais submetidos às dietas sem plasma foi bem maior do que as dosagens aplicadas nos animais que receberam dietas contendo plasma. A inclusão de 2,5% e 7,0% de plasma sangüíneo em pó teve efeito benéfico sobre a altura de vilosidade do duodeno e do jejuno de leitões desmamados aos 35 dias de idade. Esses resultados indicam que o uso de plasma em dietas para leitões desmamados aos 35 dias de idade resulta em diminuição do índice de diarréias e na melhoria do ganho de peso dos leitões criados em condições de desafio.

Palavras-chave: desmame precoce, diarréias, *Escherichia coli*, idade ao desmame

EFFECTS OF SPRAY DRIED PLASMA ON WALL STRUCTURE AND MICROBIOLOGICAL DEVELOPMENT IN THE GUT OF PIGLETS WEANED AT 35 DAYS OF AGE.

Abstract: Aiming to determining whether the plasma has other effects on 35 days of age weaned piglets that are not only related with feed intake increase, 24 piglets were used in an experiment with randomized blocks design with four treatments (diets with 0.0, 2.5, 5.0 and 7.5% of blood plasma), six repetitions and one animal experimental unit. There were not significant differences between the treatments with relation the feed/gain ratio, but were in relation the weight gain and the *E. coli* colonies amounts. The animals submitted to diets containing plasma showed greater weight gains and smaller *E. coli* amounts in the small intestine than those which feeding diets without plasma. Although not statistically analyzed, it was found that the application of antibiotics dosage in animals feeding diets without plasma was much greater than that applied in animals feeding diets with plasma. The inclusion of 2.5% and 7.0% of spray dried plasma in the diets increased villus height in jejunum and duodenum. It was concluded that the blood plasma has direct effects on the *E.coli* colonies in the small intestine and its use in diets for pigs weaned at 35 days of age results in decreasing the rate of diarrhea and improve the weight gain of piglets created in challenge conditions.

Keywords: diarrhea, early weaning, *Escherichia coli*, performance

1. INTRODUÇÃO

Além dos aspectos da alimentação a serem considerados nos estudos da idade de desmame é necessário também considerar aspectos relacionados com a saúde do leitão. O leitão recém-nascido depende da imunidade passiva transmitida pela porca. Ao nascer, o animal recebe imunoglobulinas através do colostro que são capazes de atravessar a parede intestinal durante as primeiras horas de vida. Posteriormente, o animal recebe o leite materno que proporciona imunidade local nas paredes intestinais através das imunoglobulinas (Arthington, 1997).

Ao desmame, o aporte de imunoglobulinas maternas não mais existe e a ocorrência de diversos fatores estressantes, sejam eles ligados ao manejo ou alimentação, podem exigir que o animal tenha o seu sistema de defesa ativado. A ativação do sistema imune pode afetar os processos metabólicos e o crescimento, pela interação com o sistema nervoso central; pela interação com sistema endócrino mediante a liberação de corticosteróides e tiroxina e pela interação com sistema endócrino mediante liberação de citocinas (peptídeos imunoreguladores) pelos leucócitos (Klasing et al. 1991).

Têm-se atribuído ao plasma sanguíneo, efeitos estimulantes na ingestão de dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade (Campbell et al., 2004) com conseqüente aumento no ganho de peso e melhora da conversão alimentar. Alguns autores sugerem, no entanto, que os efeitos benéficos do plasma não se resumem ao simples aumento na ingestão de alimentos mas também à capacidade de aumentar a resposta imune na primeira semana após o desmame aos 21 dias de idade (Gatnau et al., 1993), devido à presença de imunoglobulinas específicas.

É possível que o plasma possa ter efeitos no próprio intestino delgado com a manutenção da integridade das vilosidades intestinais e sobre o controle de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli*, aumentando assim o ganho de peso e diminuindo a conversão alimentar dos animais, mas é possível também que estes efeitos estejam limitados em função do desenvolvimento completo do sistema imune do leitão que se dá por volta de 35 dias de idade.

Assim, verificou-se a necessidade de se estudar se há efeitos benéficos do plasma sobre a ultra-estrutura intestinal e também se há redução do número de unidades formadoras de colônias de *E. coli* com conseqüente melhora no desempenho de leitões desmamados aos 35 dias de idade, independentemente do consumo de ração.

2. MATERIAIS E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, no período de julho a outubro de 2007.

Foram utilizados 24 leitões desmamados aos 35 dias de idade distribuídos em delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos, quatro repetições e um animal por unidade experimental. O critério para formação dos blocos foi o peso do animal ao desmame. Os tratamentos usados foram rações com 0,0; 2,5; 5,0 e 7,5% de inclusão de plasma sangüíneo.

Foram usados os teores de proteína bruta e energia digestível, bem como os níveis mínimos de cálcio, fósforo total e fósforo disponível, das dietas experimentais

conforme preconizado em Rostagno et al. (2005) e a relação cálcio:fósforo total foi mantida em 1,35 em todas as dietas experimentais.

Os tratamentos foram dietas contendo milho e farelo de soja lactose, óleo, fosfato bicálcico, calcário, sal, premix de vitaminas e premix de minerais, sendo que: no tratamento um, sem plasma, foi utilizado como fonte protéica o leite desnatado em pó, nos tratamentos dois e três foi utilizado como fonte protéica uma combinação de plasma sanguíneo em pó com leite desnatado em pó e no Tratamento 4 foi utilizado o plasma sanguíneo em pó como fonte protéica.

Lactose foi adicionada às dietas de forma a se garantir um nível próximo de 12,0% deste carboidrato em todas. Além disso, foram adicionados os aminoácidos lisina, metionina e treonina nas dietas experimentais de forma a se garantir que todas mantivessem o mesmo perfil em aminoácidos digestíveis de acordo com o conceito de proteína ideal. As relações entre os aminoácidos metionina e lisina, treonina e lisina, e triptofano e lisina seguiram o preconizado por Rostagno et al. (2005).

As composições centesimais e calculadas dos tratamentos encontram-se apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Composições centesimais e calculadas das rações experimentais.

<i>Composição centesimal</i>	Ingredientes	Níveis de plasma (%)			
		0	2,5	5,0	7,5
Milho		49,94	49,51	49,65	49,30
Farelo de Soja		25,70	25,70	25,70	25,70
Leite em pó		16,20	11,90	5,50	-----
Lactose		2,33	4,96	8,88	12,20
Plasma SP		-----	2,50	5,00	7,50
Óleo de Soja		2,42	1,82	1,46	1,18
Fosfato Bicálcico		1,60	1,75	1,92	2,07
Calcário		0,70	0,70	0,71	0,85
Sal		0,35	0,35	0,35	0,35
Premix Vitamínico ¹		0,15	0,15	0,15	0,15
Premix Mineral ²		0,10	0,10	0,10	0,10
L-Lisina HCL (98%)		0,231	0,256	0,285	0,293
DL-Metionina (98%)		0,152	0,168	0,176	0,182
L-Treonina (98%)		0,128	0,131	0,123	0,125
<i>Composição calculada³</i>					
ED (Kcal/Kg)		3500	3500	3500	3500
Proteína bruta (%)		21,20	21,53	21,20	21,13
Ca (%)		0,886	0,892	0,882	0,891
Ptotal(%)		0,652	0,661	0,658	0,660
Pdig (%)		0,482	0,491	0,488	0,490
Na (%)		0,270	0,274	0,280	0,280
Lisina dig. (%)		1,450	1,470	1,476	1,511
Treonina dig. (%)		0,913	0,926	0,930	0,952
Triptofano dig. (%)		0,247	0,250	0,251	0,257
Met+Cis dig. (%)		0,812	0,823	0,826	0,846
Arginina dig. (%)		1,055	1,134	1,206	1,280
Valina dig. (%)		0,762	0,850	0,929	1,011
Isoleucina (%)		0,708	0,732	0,745	0,762

¹ Contendo por kg: 12000 UI de Vit A; 2250 UI de Vit D₃; 27mg de Vit E; 3mg de Vit K; 2,25mg de Tiamina; 6mg de Riboflavina; 2,25mg de Piridoxina; 27 mcg de B₁₂; 400mcg de Ácido fólico; 150mcg de Biotina; 22,5mg de Ácido pantotênico e 45mg de Niacina;

² Contendo por kg: 88mg de Fe; 15mg de Cu; 80mg de Zn; 45mg de Mn; 1mg de I e 300mcg de Se.

³ Segundo Rostagno et al. (2005)

As dietas foram umidificadas e fornecidas aos animais de forma controlada em quantidades variáveis em quatro refeições diárias por um período de uma hora por trato, por doze dias. A quantidade de ração fornecida foi em função do consumo dos animais do tratamento um. Em testes anteriores determinou-se o consumo de ração inicial dos animais desmamados aos 35 dias de idade recebendo a dieta do tratamento um. As sobras de ração foram secas e pesadas e quantidades iguais foram fornecidas na refeição seguinte, de modo a se assegurar consumos iguais por repetição.

Aos 35 dias de idade os animais foram desmamados, pesados e transferidos para a creche totalmente fechada, sendo alojados em gaiolas metálicas com 1,60 m de comprimento x 1,0 m de largura, suspensas à altura de 0,56 m do chão, com pisos e laterais telados, dotadas de comedouros semi-automáticos e bebedouros tipo chupeta, localizadas em um prédio de alvenaria com piso de concreto e teto de madeira rebaixado. O aquecimento do ambiente foi feito através de lâmpadas incandescentes. A renovação de ar foi realizada quatro vezes ao dia somente no momento dos tratamentos, quando a porta da sala ficava aberta por uma hora.

Os leitões, um de cada leitegada por tratamento, foram alojados individualmente em gaiolas de creche que permitiam contato visual entre eles. Os leitões foram criados em condições de desafio sanitário. O desafio sanitário consistiu no alojamento dos leitões em uma sala de creche que estava ocupada com animais mais velhos e que não foi limpa e nem desinfetada.

Os leitões que manifestaram diarreias foram medicados com uma dose diária injetável no músculo de 1 ml de antibiótico (princípio ativo enrofloxacina), sendo adotado como critério para avaliação do índice de diarreia o seguinte: se um mesmo

animal apresentasse diarreia por mais de um dia ele receberia a cada dia uma dose e o número total de doses seria considerado índice de diarreia.

Ao final do experimento os animais foram abatidos por dessensibilização cerebral e posterior sangramento para coleta de conteúdo intestinal. Para contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Escherichia coli* a ingesta foi coletada à 30 cm da alça ileal para.

O conteúdo intestinal de leitões recém sacrificados foi coletado e armazenado em potes plásticos estéreis que foram acomodados dentro de uma bolsa térmica contendo gelo. Após as coletas as amostras foram encaminhadas para um laboratório de análise microbiológicas que realizaram a contagem de UFC de *E. coli* da seguinte forma: 1) as amostras foram homogeneizadas por inversão de pontas e o conteúdo drenado para um bécker após a lavagem das mucosas com cinco ml de água destilada; 2) as amostras foram preparadas após a pesagem do conteúdo coletado e retiradas uma alíquota de 1 ml que foi diluído em 10 ml de água destilada e a partir desta diluição foram realizadas diluições de até 1:10.000.000 de forma a viabilizar as contagens; 3) o plaqueamento foi realizado inoculando-se 1 ml da última diluição em placas de meio de cultura específico contendo alfa ou beta amilase incubadas a 35° C por 24 horas e após este período foram realizadas as contagens de *E. coli*; 4) a amostra foi removida para um cadinho identificado e tarado para pesagem e determinação da matéria seca seguindo-se a técnica descrita por Bellaver et al. (2002), sendo que os resultados foram expressos em log₁₀ de UFC por grama (g) de matéria seca.

Também se coletou ao final do experimento amostras de parede intestinal em três locais diferentes do intestino delgado para análise de altura de vilosidades.

O intestino delgado foi dissecado em sessões transversais de dois centímetros no duodeno, no jejuno e no íleo conforme descrito por Nickel et al.,(1973). As amostras foram imersas em solução fixadora (solução de *Bouin*) por 24 horas e em seguida lavadas e transferidas para a solução de álcool etílico a 70,0%. Após desidratação dos segmentos intestinais, eles foram recortados em fragmentos de cerca de 1 cm, diafanizados em benzol e incluídos em parafina. Utilizando-se um micrótomo, foram produzidas seções com 7 μm de espessura, as quais foram coletadas de modo que, entre uma seção e a subsequente sejam eliminadas 30. As amostras foram coloridas por hematoxilina e eosina seguindo-se a técnica de Teixeira (1999). As lâminas contendo os cortes histológicos foram preparadas no laboratório de Histologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. As medidas de altura de vilosidade foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, através de analisador de imagem “Imagepro Plus 1.3.2” (1994) e microscópio óptico. Para cada lâmina foram feitas 30 medidas de vilosidades.

Os dados de GP e CA foram submetidos à análise de variância e regressão, utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000). As estimativas de exigência de plasma sanguíneo foram determinadas por análise de regressões utilizando o modelo linear ou quadrático, conforme o melhor ajustamento obtido para cada variável.

Os resultados de colônias de *E. coli* foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett a 10,0% utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000). Os dados referentes à microbiologia intestinal, originalmente em ufc/g

(unidades formadoras de colônias/g de amostra) foram transformados pela função $y = \log x$, em que x é o número de unidades formadoras de colônias/g (ufc/g).

Foram realizadas análises descritivas visando-se relacionar a ocorrência de diarreia com o número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*.

Os dados referentes à altura de vilosidades foram comparados pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV, 2000).

Foram realizadas análises descritivas visando-se relacionar a ocorrência de diarreia com o número de Unidades Formadoras de Colônias de *E. coli*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de peso inicial (PI) e os resultados relativos ao consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID) e unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) dos animais desmamados aos 35 dias de idade encontram-se apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Peso inicial (PI), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID) e unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) dos animais desmamados aos 35 dias de idade.

Parâmetros	Níveis de plasma (%)				CV (%)
	0	2,5	5	7,5	
PI, kg	12,64	12,65	12,61	12,62	-
CR, kg	7,66	7,66	7,66	7,66	-
GP, kg	4,94a	5,68b	5,95b	5,78b	14,18
CA	1,47	1,35	1,29	1,32	13,18
ID	20	11	5	6	-
UFC, g/ml	3,8x10 ⁶ b	1,3x10 ⁶ a	4,7x10 ⁵ a	1,3x10 ⁵ a	34,6

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunnet a 10,0%.

Não foram constatadas diferenças entre os tratamentos em relação às conversões alimentares, mas foram em relação aos ganhos de peso e às quantidades de colônias de *E. coli*. Os animais submetidos às dietas contendo plasma sanguíneo apresentaram maiores ganhos de peso e menores quantidades de *E. coli* no intestino delgado que os animais que receberam dietas sem plasma. Embora não analisado estatisticamente, constatou-se que a aplicação de dosagens de antibióticos nos animais submetidos a dietas sem plasma foi bem maior do que as dosagens aplicadas nos animais que receberam dietas contendo plasma.

Observou-se que a inclusão de 2,5% de plasma sanguíneo em pó reduziu ($P < 0,10$) a incidência de colônias de *E. coli* e aumentou ($P < 0,01$) o ganho de peso em leitões desmamados aos 35 dias de idade.

A proliferação desordenada de microorganismos patogênicos no intestino delgado dos leitões tem como resultado mais freqüente a ocorrência de diarreias. Tal quadro leva a queda no desempenho dos animais, com redução no consumo e redução no ganho de peso diário. Constatou-se que houve uma relação direta entre a quantidade

de colônias de *E. coli* com a ocorrência de diarreias e ganho de peso e pode-se atribuir ao plasma a melhora no desempenho dos animais pela diminuição da proliferação bacteriana.

É certo dizer, portanto, que a inclusão de plasma sanguíneo em pó nas dietas de leitões desmamados aos 35 dias de idade levou à redução do número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) de *E. coli* com ação direta sobre o desempenho dos leitões. Tal melhora vem de encontro ao descrito por diversos autores (Gatnau e Zimmermann, 1994; Bosi et al., 2001; Coffey e Cromwell, 2001; Van Dijk et al., 2001).

Uma das prováveis justificativas é de que o plasma sanguíneo na dieta, por meio do controle da proliferação bacteriana, reduziu a ocorrência de processos inflamatórios e conseqüentemente diminuição do desvio de energia que seria utilizada para o crescimento para a manutenção do sistema imune ativado. A exposição a antígenos pode fazer com que o sistema de defesa do animal seja ativado para neutralizá-los antes que estes possam colocar em perigo a vida dos leitões.

Bosi et al. (2004) observaram que a expressão de citocinas pro-inflamatórias foi menor em animais que receberam plasma, o que, de certa forma, contribui para o aumento do consumo de alimentos e conseqüente direcionamento dos nutrientes para produção (ganho de peso) e não para a manutenção do sistema imune ativado (Moretó et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados por Moretó et al. (2008) e Pérez-Bosque et al.(2008).

É conclusivo que a manutenção do equilíbrio da flora intestinal de leitões desmamados aos 35 dias de idade é de suma importância para o bom desenvolvimento

desses animais. Nesse aspecto, o plasma parece ser deveras eficiente, controlando a proliferação de microorganismos patogênicos.

Outro aspecto que deve ser observado é que durante a lactação, o sistema enzimático dos leitões está adaptado para digerir os nutrientes do leite (proteínas lácteas, lactose e lipídios de cadeia curta) e até os 28 dias de idade, seu sistema digestivo não produz quantidades suficientes de amilases, lipases e outras enzimas que degradam os nutrientes contidos nas matérias primas de origem vegetal. O completo desenvolvimento do sistema enzimático dos leitões se dá, independentemente do substrato, entre 35 a 42 dias de idade. Tem-se verificado que animais desmamados aos 21 dias de idade não se adaptam a dietas com quantidades elevadas de farelo de soja devido à ocorrência de uma queda brusca na produção de enzimas apropriadas para digestão de proteínas lácteas. Por isso, leitões que recebem dietas com quantidades de farelo de soja superiores a 20,0% podem perder conteúdos protéicos da mucosa intestinal e sofrerem sensíveis alterações da profundidade das criptas e na altura das vilosidades intestinais (Jiang et al., 2000, Schimidt et al., 2003, Torrallardona et al., 2003 e Lenehan et al., 2007).

Na fase pré-desmame, as vilosidades intestinais são largas e bem estruturadas o que assegura eficiência na absorção de nutrientes. No entanto, no momento do desmame, dependendo da idade dos animais e do alimento usado, o tamanho das vilosidades pode ser reduzido com concomitante diminuição das profundidades das criptas, e em decorrência disto, pode ocorrer redução na área de absorção no intestino delgado e aumento na proporção de enterócitos imaturos nos extremos das vilosidades (Pluske et al. 1991).

Algumas frações do plasma sanguíneo em pó, como fatores de crescimento epidermal podem atuar de maneira trófica às vilosidades do intestino delgado. Além disso, a própria presença de imunoglobulinas pode contribuir para a redução da atrofia das vilosidades e comprometimento da morfologia intestinal.

Os dados de altura de vilosidades no duodeno, jejuno e íleo estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Altura de vilosidades dos diferentes segmentos do ID (duodeno, jejuno e íleo) de leitões desmamados aos 35 dias de idade.

Altura de vilosidades, μm	Tratamentos				CV (%)
	1	2	3	4	
Duodeno	331a	377b	330a	401b	8,04
Jejuno	300a	340b	326a	346b	9,33
Íleo	264	282	241	311	18,02

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Dunnet a 10%.

Yi et al. (2005), em um estudo com leitões desmamados precocemente (17 ± 2 dias de idade), avaliaram o efeito da inclusão de plasma e nucleotídeos nas dietas pós-desmame sobre a morfologia do intestino delgado de animais desafiados com *E. coli*. Os autores analisaram altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilo:cripta, área e volume dos vilos, em três segmentos do intestino delgado (jejuno proximal e médio e íleo) e observaram que animais desafiados com *E. coli* recebendo dietas com a inclusão tanto de plasma quanto de nucleotídeos mantiveram a integridade intestinal no jejuno médio quando comparados aos animais não desafiados por *E. coli*. Da mesma forma não houve diferença na altura de vilosidade, relação vilo:cripta e área de vilosidade, embora tenham apresentado menor volume de vilosidades ($P < 0,01$). Os resultados observados no íleo seguiram a mesma tendência, com os animais desafiados

que receberam plasma tendo a integridade intestinal mantida, com resultados similares entre todos os parâmetros analisados quando comparados aos animais não desafiados.

Em outros estudos não se observou, no entanto, efeitos da inclusão de plasma sobre a altura de vilosidade e profundidade de cripta de leitões desmamados aos 20 dias, sugerindo que o plasma não tem efeitos tróficos específicos tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso, não evitando, portanto, danos causados à parede intestinal associado com o desmame (Nofrarías et al., 2006).

Observou-se neste experimento efeitos ($P > 0,05$) do plasma sanguíneo em pó sobre a altura de vilosidades de diferentes segmentos do intestino delgado de leitões desmamados aos 35 dias de idade. Os animais que receberam os Tratamentos 2 e 4 apresentaram respectivamente, alturas de vilosidades no jejuno e duodeno superiores aos animais que receberam os demais tratamentos.

Van Dijk, et al. (2002), avaliando, dentre outras características, altura de vilosidade e profundidade de cripta, não observaram efeito trófico do plasma dietético sobre os parâmetros avaliados quando fornecido no nível de 8% de inclusão em dietas para leitões desmamados aos 18 dias. Touchette et al. (2002) avaliando a inclusão de 7% de plasma em dietas para leitões desmamados aos 14 dias de idade também não observaram efeito sobre a altura de vilosidade. Verificaram, no entanto, redução da profundidade de cripta dos animais que foram desafiados.

4. CONCLUSÃO

O plasma sanguíneo tem efeitos diretos sobre a colonização de *E.coli* no intestino delgado. A inclusão crescente de plasma reduziu linearmente ($P<0,10$) a incidência de colônias de *E. coli* e aumentou linearmente ($P<0,01$) o ganho de peso em leitões desmamados aos 35 dias de idade. A inclusão de 2,5% e 7,0% de plasma sanguíneo em pó teve efeito ($P>0,05$) benéfico sobre a altura de vilosidade do duodeno e do jejuno de leitões desmamados aos 35 dias de idade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHINGTON, J. A. et al. The use of concentrated spray dried plasma protein in pre-weaned and neonatal pig. **American Association of Swine Practitioners**, p.123-124, 1997.

BELLAVER, C., COSTA, C.A.F., MACHADO, H.G.P., LIMA, G.J.M.M. Modelo experimental para pesquisa e desenvolvimento de aditivos alternativos para frangos de corte. Comunicado técnico nº 315. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves. 2002.

BOSI, P.; HAN, I. K.; JUNG, H. J. et al. Effect of different spray dried plasmas on growth, ileal digestibility, nutrient deposition, immunity and health of early weaned pigs challenged with E. coli K88. **Asian-Aus. J. Anim. Sci.**, v.14, p.1138–1143, 2001.

BOSI, P. et al. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic Escherichia coli K88. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.1764–1772, 2004.

CAMPBELL, J. M.; QUIGLEY III, J. D.; RUSSELL, L. E. e KOEHNK, L. D.. Efficacy of spray-dried bovine serum on health and performance of turkeys challenged with Pasteurella multocida. **J. Appl. Poult. Res.**, v.13, p.388–393, 2004.

COFFEY, R. D., e CROMWELL, G. L. Use of spray-dried animal plasma in diets for weanling pigs. **Pig News Inf.**, v.22, p.39–48, 2001.

EASTER, R. A. Acidification in diets for pigs. **Recent Advances Animal Nutrition**. Ed. HARESIGN, W. e COLE, D. J. A. London. 61-72. 1988.

FRANK, J. W. et al. The effects of thermal environments and spray-dried plasma on the acute-phase response of pigs challenged with lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1166-1176, 2003.

GATNAU, R. et al. Spray dried porcine plasma as an alternative ingredient in diets of weanling pigs. **Pig News and information**, v. 14, n. 4, p. 157-159, 1993.

GATNAU, R. e ZIMMERMAN, D. R. Effects of spray dried plasma of different sources and process on growth performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 166, 1994.

JIANG, R. et al. Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 21-26, 2000.

KLASING, K. C.; JOHNSTONE, B. J. e BENSON, B. N. Implications on and immune response on growth and nutrient requirements of chicken. **Recent Advances in Animal Nutrition**. Eds.HARESIGN, W. e COLE, D. J. A. London, 135-146p. 1991.

LENEHAN, N.A.; DEROCHEY, J. M.; GOODBAND, R. D.; TOKACH, M. D.; DRITZ, S. S.; NELSEN, J. L.; GROESBECK, C. N. e LAWRENCE, K. R. Evaluation of soy protein concentrates in nursery pig diets. **Journal of Animal Science**. v.85, p.3013-3021, 2007.

MAYES, P. A. Digestion and absorption. **Harpers Biochemistry**, Eds. MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. e RODWELL, V. W. Connecticut, 580p, 1990.

MORETÓ, M.; MIRÓ, L.; POLO, J. et al. Oral porcine plasma proteins prevent the release of mucosal pro-inflammatory cytokines in rats challenged with *S. aureus* enterotoxin B. **Digestive Disease Week**, San Diego, CA, May 17–22, 2008.

MORETÓ, M. e PÉREZ-BOSQUE, A. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. **Journal of Animal Science**, v. **87**, p.92-100, 2009.

NICKEL, R., SCHUMMER, A. e SEIFERLE, E. The Viscera of the Domestic Mammals. **Verlag Paul Parey**, Berlin, 1973.

NOFRARÍAS, M.; MANZANILLA, E. G.; PUJOLS, J. et al. Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p.2735–2742, 2006.

OWUSU-ASIEDU, A. et al. Response of early-weaned pigs to spray-dried porcine or animal plasma-based diets supplemented with egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2895-2903, 2002.

OWUSU-ASIEDU, A., C.; NYACHOTI, M. e MARQUARDT, R. R. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichiacoli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1790–1798, 2003.

PÉREZ-BOSQUE, A.; MIRÓ, L.; POLO, J.; RUSSELL, L.; CAMPBELL, J.; WEAVER, E.; CRENSHAW, J. e MORETÓ, M. Dietary plasma proteins modulate the

immune response of diffuse gut-associated lymphoid tissue in rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. **J. Nutr.**, v.138, p.533–537, 2008.

PIERCE, J. L.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D. e COFFEY, R. D. Assessment of three fractions of spray-dried plasma on performance of early-weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v.73(Suppl.1), p.81 (Abstr.), 1995.

PLUSKE, J. R.; WILLIAMS, I. H. e AHERNE, F. X. **Maintenance of villous height and crypt depth in the small intestine of weaned pigs**. En: *Manipulating pig production III*. Ed. Baterham. Australian Pig Science Association. 143p., 1991.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG:UFV, 2005. 186p.

SCHIMIDT, L.S.; NYACHOTI, C.M.; SLOMINSKI, B.A. nutritional evaluation of egg byproducts in diets for early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2270-2278, 2003.

STHALY, T. Influencia de la activacion del sistema inmunitario sobre la productividad y las características nutricionales de dietas para cerdos. **Avances en nutrición e alimentación animal**. Eds. REBOLLAR, P.G.; MATEOS, G.G.; BLAS, C. Madri, 96p., 1996.

TEIXEIRA, A.O. **Efeito de dietas simples e complexas sobre a morfologia intestinal de leitões até 35 dias de idade**. Viçosa: UFV, 1999. 60P. Dissertação de Mestrado.Universidade Federal de Viçosa. 1999.

TORRALLARDONA, D. et al. Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology and performance of weanling pigs challenged with Escherichia coli K99. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1220-1226, 2003.

TOUCHETTE, K.J.; CARROLL, J. A.; ALLEE, G. L.; MATTERI, R. L.; DYER, C. J. BEAUSANG, L. A. e ZANNELLI, M. E. The effects of plasma, lactose, and soil protein sources fed in a phase 1 diet on nursery performance. **Journal of Animal Science**, v.80, p. 494–501, 2002.

VAN DIJK, A. J.; EVERTS, H.; NABUURS, M. J. A. et al. Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: A review. **Livest. Prod. Sci.**, v.68, p.263–274, 2001.

VAN DIJK, A. J.; NIEWOLD, T. A.; NABUURS, M. J. et al. Small intestinal morphology and disaccharidase activities in early-weaned piglets fed a diet containing spraydried porcine plasma. **J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.49, p.81–86, 2002.

YI, G.F.; CARROLL, J.A.; ALLEE, G.L. et al. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of Escherichia coli K88+-challenged weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.83, p.634-643, 2005.

APÊNDICE

Tabela 11. Ganho de peso total (GP), consumo de ração total (CR), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID), unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) e peso inicial de cada animal desmamado aos 21 dias de idades.

Tratamento	Repetição	GP (kg)	CR (kg)	CA	ID	UFC(g/ml)	PI (kg)
1	1	2,00	3,49	1,74	0	1,3x10 ⁸	8,00
1	2	1,98	2,97	1,50	0	1,4x10 ⁹	6,24
1	3	0,90	3,41	3,79	2	3,2x10 ⁹	7,64
1	4	0,73	2,89	3,96	3	12,0x10 ¹⁰	6,06
1	5	2,88	4,50	1,56	0	-	5,92
1	6	3,06	4,56	1,49	0	-	7,24
Média		2,03	3,79	1,87	5	3,87x10⁹c	6,99
2	1	1,76	3,49	1,98	2	5,0x10 ⁸	7,62
2	2	2,10	2,97	1,41	0	4,5x10 ⁷	6,36
2	3	2,16	3,41	1,58	0	9,5x10 ⁶	7,17
2	4	1,18	2,89	2,45	3	1,6x10 ⁷	5,82
2	5	3,20	4,50	1,41	2	-	6,00
2	6	4,06	5,46	1,34	2	-	7,58
Média		2,41	3,79	1,57	9	5,63x10⁷b	6,73
3	1	1,94	3,49	1,80	2	1,3x10 ⁸	7,62
3	2	1,94	2,97	1,53	0	6,1x10 ⁶	6,36
3	3	1,87	3,41	1,83	2	1,6x10 ⁶	6,98
3	4	2,01	2,89	1,44	0	5,3x10 ⁶	5,88
3	5	2,80	4,50	1,61	2	-	5,90
3	6	3,88	5,46	1,41	3	-	7,92
Média		2,41	3,79	1,57	9	1,03x10⁶aa	6,71
4	1	2,72	3,49	1,28	0	2,0x10 ⁶	7,52
4	2	1,74	2,97	1,70	1	9,2x10 ⁶	6,40
4	3	2,12	3,41	1,61	1	1,1x10 ⁸	6,10
4	4	2,15	2,89	1,35	0	6,0x10 ⁶	5,68
4	5	3,02	4,50	1,49	0	-	5,98
4	6	4,58	5,46	1,19	2	-	7,78
Média		2,72	3,79	1,39	4	0,71x10⁶aa	6,43
C.V. (%)		42,06		36,67		53,5	

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Dunnett a 10,0%.

Tabela 12. Ganho de peso total (GP), consumo de ração total (CR), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID), unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) e peso inicial de cada animal desmamado aos 28 dias de idades.

Tratamento	Repetição	GP (kg)	CR (kg)	CA	ID	UFC (g/ml)	PI (kg)
1	1	4,27	6,22	1,46	4	1,2x10 ⁴	9,90
1	2	5,06	6,26	1,24	0	1,4x10 ⁶	9,08
1	3	4,15	6,08	1,47	2	1,5x10 ⁶	8,55
1	4	5,25	6,07	1,16	1	1,3x10 ⁶	8,21
1	5	4,71	5,79	1,23	2	4,5x10 ⁵	6,33
1	6	2,48	5,37	2,17	6	7,0x10 ⁵	9,82
Média		4,49	5,97	1,38	15	8,9x10⁵b	8,65
2	1	5,75	6,22	1,08	0	7,2x10 ⁵	9,75
2	2	5,32	6,26	1,18	0	2,9x10 ⁵	8,80
2	3	5,86	6,08	1,04	0	2,9x10 ⁶	8,60
2	4	5,20	6,07	1,17	0	5,5x10 ⁵	8,00
2	5	3,85	5,79	1,50	0	1,8x10 ⁶	6,75
2	6	3,80	5,37	1,41	4	1,8x10 ⁶	9,82
Média		4,96	5,97	1,20	4	1,3x10⁵a	8,62
3	1	5,10	6,22	1,22	0	4,5x10 ⁵	9,45
3	2	4,32	6,26	1,45	0	7,9x10 ⁵	9,40
3	3	5,28	6,08	1,15	1	2,5x10 ⁵	8,50
3	4	4,74	6,07	1,28	0	5,7x10 ⁵	7,90
3	5	4,15	5,79	1,40	0	1,8x10 ⁶	6,50
3	6	2,96	5,37	1,81	0	9,0x10 ⁵	11,18
Média		4,43	5,97	1,35	1	7,9x10⁵a	8,82
4	1	6,11	6,22	1,02	2	6,5x10 ⁵	9,85
4	2	6,07	6,26	1,03	0	1,8x10 ⁶	8,65
4	3	4,9	6,08	1,24	0	2,0x10 ⁵	8,60
4	4	3,94	6,07	1,54	3	1,0x10 ⁶	8,20
4	5	3,88	5,79	1,49	5	4,2x10 ⁶	6,41
4	6	2,84	5,37	1,89	0	2,6x10 ⁵	11,18
Média		4,62	5,97	1,29	10	2,0x10⁵a	8,82
C.V. (%)		22,50		21,57		34,6	

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Dunnet a 10,0%.

Tabela 13. Ganho de peso total (GP), consumo de ração total (CR), conversão alimentar (CA), índice de diarreia (ID), unidades formadoras de colônias de *E. coli* (UFC) e peso inicial de cada animal desmamado aos 35 dias de idades.

Tratamento	Repetição	GP (kg)	CR (kg)	CA	ID	UFC (g/ml)	PI (kg)
1	1	5,02	7,25	1,44	5	1,8x10 ⁸	13,60
1	2	5,38	7,69	1,43	2	1,1x10 ⁶	12,00
1	3	4,42	7,49	1,69	6	1,7x10 ⁶	11,70
1	4	5,24	7,30	1,39	2	1,3x10 ⁶	11,56
1	5	6,64	7,99	1,20	1	2,0x10 ⁴	13,96
1	6	4,63	8,25	1,78	6	4,0x10 ⁵	13,00
Média		4,94a	7,66	1,47	20	3,8x10⁶b	12,64
2	1	5,32	7,25	1,36	4	2,0x10 ⁶	15,02
2	2	4,42	7,69	1,74	3	4,7x10 ⁵	13,00
2	3	5,42	7,49	1,38	2	1,8x10 ⁶	12,06
2	4	5,92	7,30	1,23	1	1,8x10 ⁶	9,10
2	5	6,46	7,99	1,24	1	2,0x10 ⁶	13,96
2	6	6,56	8,25	1,26	0	1,7x10 ³	12,76
Média		5,68b	7,66	1,35	11	1,3x10⁶a	12,65
3	1	5,14	7,25	1,41	0	4,5x10 ⁴	15,12
3	2	5,68	7,69	1,35	0	8,0x10 ⁴	12,00
3	3	6,05	7,49	1,24	2	1,3x10 ⁶	11,65
3	4	5,80	7,30	1,26	1	3,0x10 ⁵	10,00
3	5	6,96	7,99	1,15	1	3,3x10 ⁵	13,66
3	6	6,06	8,25	1,36	1	7,0x10 ⁵	13,24
Média		5,95b	7,66	1,29	5	4,7x10⁵a	12,61
4	1	4,90	7,25	1,48	2	5,2x10 ⁵	13,60
4	2	4,62	7,69	1,66	1	2,5x10 ⁵	13,30
4	3	6,38	7,49	1,17	1	2,5x10 ⁶	11,42
4	4	5,70	7,30	1,28	1	1,7x10 ⁵	10,40
4	5	5,80	7,99	1,38	1	4,2x10 ⁶	13,54
4	6	7,30	8,25	1,13	0	2,5x10 ⁵	13,44
Média		5,78b	7,66	1,32	6	1,3x10⁶a	12,62
C.V. (%)		14,18		13,18		46,4	

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Dunnet a 10,0%.

Tabela 14. Análise de variância e coeficiente de variação referente ao ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de leitões desmamados aos 21 dias de idade em função dos tratamentos.

Fonte de Variação	GL		Quadrado Médio		F	CV (%)	Signif.
	Trat.	Res.	Trat.	Res.			
GP (kg/dia)	3	20	0.4854861	1.010552	0.480	42,06	
Linear			1.300001		1.286		0.27012
Quadrático			0.7350000E-02		0.007		*****
Cúbico			0.1491075		0.428		*****
CA	3	20	0.9394410	0.4208140	2.232	36,67	
Linear			2.355984		5.599		0.02818
Quadrático			0.3478155		0.827		*****
Cúbico			0.1145232		0.272		*****

Tabela 15. Análise de variância e coeficiente de variação referente à altura de vilosidade e profundidade de cripta dos diferentes segmentos do intestino delgado de leitões desmamados aos 21 dias de idade em função dos tratamentos.

	GL		QM Trat.	QM Res.	F	CV (%)
	Trat.	Res.				
Altura de vilosidades, μm	3	14			1.212	
Duodeno			61219.37	16479.24		35,56
Jejuno			8809.375	17781.47		33,62
Íleo			26932.37	13906.44		31,82
Profundidade de cripta, μm	3	14			1.650	
Duodeno			296.3750	8778.792		33,07
Jejuno			16806.11	5526.783		21,80
Íleo			66323.49	12094.77		28,83

Tabela 16. Análise de variância e coeficiente de variação referente ao ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de leitões desmamados aos 28 dias de idade em função dos tratamentos.

Fonte de Variação	GL		Quadrado Médio		F	CV (%)	Signif.
	Trat.	Res.	Trat.	Res.			
GP (kg/dia)	3	20	0,4854861	1,010552	0,480	42,06	
Linear			1,300001		1,286		0,27012
Quadrático			0,7350000E-02		0,007		*****
Cúbico			0,1491075		0,428		*****
CA	3	20	0,9394410	0,4208140	2,232	36,67	
Linear			2,355984		5,599		0,02818
Quadrático			0,3478155		0,827		*****
Cúbico			0,1145232		0,272		*****

Tabela 17. Análise de variância e coeficiente de variação referente à altura de vilosidade e profundidade de cripta dos diferentes segmentos do intestino delgado de leitões desmamados aos 28 dias de idade em função dos tratamentos.

	GL		QM Trat.	QM Res.	F	CV (%)
	Trat.	Res.				
Altura de vilosidades, μm	3	2				
Duodeno			3665.682	2829.202	0.960	15,46
Jejuno			4304.708	3245.792		17,89
Íleo			9096.153	1696.358		14,17
Profundidade de cripta, μm	3	2			1.044	
Duodeno			5006.335	602.1150		7,98
Jejuno			1532.122	898.3188		10,03
Íleo			1340.582	833.4233		11,42

Tabela 18. Análise de variância e coeficiente de variação referente ao ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de leitões desmamados aos 35 dias de idade em função dos tratamentos.

Fonte de Variação	GL		Quadrado Médio		F	CV (%)	Signif.
	Trat.	Res.	Trat.	Res.			
GP (kg/dia)	3	20	0.5832173	0.6442590	0.905	14,18	
Linear			1.143091		1.77		0.19783
Quadrático			0.5903207		0.916		*****
Cúbico			0.1624013E-01		0.025		*****
CA	3	20	0.4101458E-01	0.3291432E-01	1.246	13,18	
Linear			0.7324916E-01		2.226		0.15135
Quadrático			0.4784181E-01		1.454		0.24203
Cúbico			0.1952762E-02		0.059		*****

Tabela 19. Análise de variância e coeficiente de variação referente à altura de vilosidade dos diferentes segmentos do intestino delgado de leitões desmamados aos 35 dias de idade em função dos tratamentos.

	GL		QM Trat.	QM Res.	F	CV (%)
	Trat.	Res.				
Altura de vilosidades, μm	3	2			1.072	
Duodeno			7389.833	838.9167		8,04
Jejuno			2499.855	939.3417		9,33
Íleo			5293.000	2444.717		18,02